

Erstellung von altersabhängigen Richtwerten
der Ausscheidung von Katecholaminen
und deren Metaboliten im 24-Std.-Urin
von Kleinkindern als Grundlage
für die Neuroblastomdiagnostik

Joachim Petzold

Diss
München
1986





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547928_0027

Aus dem Institut für Klinische Chemie am
Städtischen Krankenhaus München - Schwabing

Direktor: Prof. Dr. O.H. Wieland

Erstellung von altersabhängigen Richtwerten der Ausscheidung
von Katecholaminen und deren Metaboliten im 24-Std.-Urin von
Kleinkindern als Grundlage für die Neuroblastomdiagnostik.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Joachim Petzold

aus

Augsburg

Jahr

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. O.H. Wieland

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.1986

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A	<u>E I N L E I T U N G</u>	
1.	Die Neuroblastomerkkrankung	1
2.	Die Katecholamine	3
3.	Katecholaminsekretion bei Neuroblastom	7
4.	Ziel der vorliegenden Arbeit	10
B	<u>E X P E R I M E N T E L L E R T E I L</u>	
1.	Probandenkollektiv	11
2.	Probengewinnung des 24-Std.-Urins	11
3.	Analytik der Katecholamine und der Metaboliten	13
3.1.	Prinzip der Abtrennung aus dem Urin	13
3.2.	Prinzip der Messungen	13
3.3.	Analyse	16
3.3.1.	Isolierung der Eluate 1 - 3	16
3.3.1.1.	Arbeitsschritte Eluat 1 (A, NA, Dg)	18
3.3.1.2.	Arbeitsschritte Eluat 2 (MN)	18
3.3.1.3.	Arbeitsschritte Eluat 3 (Df)	19
3.3.2.	Messung der Eluate	19
3.3.2.1.	Messung von A und NA mittels Spektralfluorometer	19
3.3.2.2.	Messung von MN mittels Spektralphotometer	23
3.3.2.3.	Messung von Dg und von Df mittels Spektralfluorometer	24
3.3.2.4.	Messung von Dg und von Df mittels Hochdruckflüssig- keitschromatographie	27
4.	Qualitätskontrolle	28
5.	Messungen der Bezugsgrößen	29
6.	Methodik der Auswertung	30

C	<u>E R G E B N I S S E und D I S K U S S I O N</u>	
1.	Altersabhängige Spannweiten der Bezugsgrößen im Probandenkollektiv.	31
2.	Graphische Darstellung der altersabhängigen Spannweite der Referenzwerte und der altersabhängigen 50 %- und 95 %-Perzentilen der Ausscheidung der gemessenen Substanzen:	32
2.1.	Ausscheidung im 24-Std.-Urin	32
2.2.	Ausscheidung im 24-Std.-Urin pro Creatinin	38
2.3.	Ausscheidung im 24-Std.-Urin pro Körpergewicht	41
2.4.	Ausscheidung im 24-Std.-Urin pro Körperoberfläche	44
3.	Altersabhängige Richtwerte der Ausscheidung von Katecholaminen und deren Metaboliten im 24-Std.-Urin von Kleinkindern als Grundlage für die Neuroblastomdiagnostik.	47
4.	Altersabhängige Richtwerte der Ausscheidung von Gesamtkatecholaminen, Metanephrinen und freiem Dopamin pro Creatininausscheidung, pro Körpergewicht und pro Körperoberfläche im 24-Std.-Urin.	50
5.	Empfehlung für die Neuroblastomdiagnostik anhand der Bestimmung von Katecholaminen und deren Metaboliten im 24-Std.-Urin bei Kleinkindern.	52
6.	Vergleich der Messungen von Df und Dg mittels Spektralfluorometer und mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie anhand einer Stichprobe (n=22), durch Prüfung der Korrelation und t-Test für paarweise angeordnete Meßwerte.	53
D	<u>Z U S A M M E N F A S S U N G</u>	56
E	<u>L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S</u>	60
F	<u>A N H A N G</u>	63
1.	Beispiel für die Bestimmung der Perzentilen; Abb.23 ;	63
2.	Ausführliche Perzentilen, Spannweite und Median mit 95 %-Vertrauensbereich der Ausscheidung der gemessenen Substanzen; Tab.8-22 ;	64
3.	Standardisierter Fragebogen	79

ABKÜRZUNGEN

A	gesamtes Adrenalin
Abb.	Abbildung
C	Creatininausscheidung im Urin
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
Df	freies Dopamin
Dg	gesamtes Dopamin
FG	Frühgeborene(r)
G	Körpergewicht der Probanden am Sammeltag
GK	Gesamtkatecholamine ($\hat{=}$ A + NA)
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HVS	Homovanillinsäure
Hw, hw	Hauptwert
KU	Kontrollurin
Lj.	Lebensjahr(e)
Lw, lw	Leerwert
MAO	Monoaminoxidase
min	Minute(n)
MN	gesamte Metanephrine (Methyl-Adrenalin + Methyl-Noradrenalin)
n	Anzahl
NA	gesamtes Noradrenalin
NG	Neugeborene(r)
O	Körperoberfläche der Probanden am Sammeltag
PU	Poolurin
RLw	Reagensleerwert
s	Sekunde

SSW	Schwangerschaftswoche(n)
Std.	Stunde(n)
Tab.	Tabelle
Tg.	Tag(e)
UV	Ultraviolett
VB	Vertrauensbereich
VMS	Vanillinmandelsäure
V	Variationskoeffizient
$\tilde{x}$	Median
$\bar{x}$	Mittelwert
μ_d	wahre mittlere Differenz

A E I N L E I T U N G

1. Die Neuroblastomerkrankung

Pathologie und Altersverteilung:

Neuroblastome (Sympathogoniome u. Sympathoblastome) und Ganglioneuroblastome sind embryonale maligne neurogene Tumoren des adrenosympathischen Systems aus unterschiedlich differenzierten sympathischen Ganglienzellen.

Die wenig differenzierten Neuroblastome treten bevorzugt im Kindesalter auf, ihr Anteil an den soliden malignen Tumoren dieses Alters beträgt 7-15 % (1,4,22). Bei 17 von 100 000 Neugeborenen muß vor Erreichen des 16. Lebensjahrs mit einem Neuroblastom gerechnet werden, wobei dieses bereits beim Feten auftreten kann. Über 80 % werden vor Vollendung des 5. Lebensjahrs diagnostiziert, mit steigendem Lebensalter wird die Erkrankung zunehmend seltener:

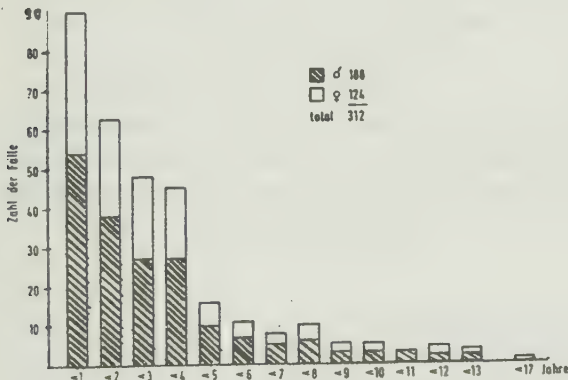


Abb.1: Alter zur Zeit der Diagnosestellung und Geschlecht von 312 Patienten mit Neuroblastom (15).

Das ausdifferenziertere weniger bösartige, vor allem im Thoraxbereich lokalisierte Ganglioneuroblastom findet sich ebenfalls schon beim Säugling, zeigt aber nicht die altersspezifische Häufung.

Beide, Neuroblastom und Ganglioneuroblastom, treten bei Knaben häufiger auf als bei Mädchen: ♂ : ♀ = 3 : 2 (15).

Der überwiegende Teil (ca. 75 %) aller malignen Sympathikustumoren entwickelt sich primär im Bauchraum: etwa 50 % in den Nebennieren, 25 % im benachbarten Grenzstrang. Grundsätzlich können sie aber überall dort auftreten, wo sich sympathische Ganglienzellen befinden, also auch im Bereich des hinteren Mediastinums (12 %) und im Halsbereich (2 %) sowie selten in den intermuralen Ganglien (2,10,20,35). Hämatogene und lymphogene Frühmetastasierung erfolgt in die Lymphknoten, die Leber (Typ Pepper), das Skelett (Typ Hutchison), die Haut, selten in die Lunge. 60 - 75 % der Patienten haben bei Diagnosestellung bereits Metastasen, 40 % davon im Knochen, meist im Schädel (25,32).

Die Prognose ist abhängig vom (32):

- Lebensalter,
- Ausbreitungsstadium
- Lokalisationsort,
- histologischen Differenzierungsgrad.

Neben sehr seltener Ausdifferenzierung der Tumorzellen und somit Spontanheilungen im frühen Säuglingsalter, haben Säuglinge die größte Aussicht am längsten ohne Tumorrezidiv zu bleiben, mit steigendem Lebensalter nimmt die Rezidivhäufigkeit rapide zu. Kinder ohne Metastasennachweis bei Diagnosestellung überleben im Durchschnitt viermal länger als solche mit bereits erfolgter Metastasierung bei Behandlungsbeginn (25). Die 1971-75 geschätzte 5-Jahre Überlebensrate bei Neuroblastom beträgt 30 % (4).

Klinik und Diagnostik:

Die klinischen Symptome des Primärtumors sind meist gering und unspezifisch: Müdigkeit, Schwäche, Inappetenz, Dystrophie, Erbrechen, Fieber, progrediente Anämie sind am häufigsten (15). Harnwegsobstruktion, Ileus, Schwäche in den Beinen, Gangstörungen, evtl. eine Paraplegie, oder Myoklonien können auftreten (32). Eher als der Primärtumor verursachen die Metastasen Symptome wie Knochenschmerzen und Fieber bei Knocheninfiltration, Hepatomegalie bei Lebermetastasen oder Protrusio bulbi bei retrobulbären Absiedelungen. Aufgrund fehlender spezifischer Beschwerden, erfolgt eine erste Verdachtsdiagnose häufig bei einer Routinepalpation

des Abdomens, wobei die Patienten durch einen häufig die Mittellinie überschreitenden Bauchtumor auffallen (DD gegenüber Wilms-Tumor). Weitere Hinweise können milchglasartige Verschattungen in der Röntgenaufnahme von Thorax und Abdomen, auf denen ca. die Hälfte der Neuroblastome feine spritzerartige Verkalkungen zeigen, Verschiebung der Därme nach ventral, eine im i.v. Pyelogramm verlagerte Niere ohne Kelchdeformitäten, oder knotige Schwellungen am Hals sein. Sonographie, Skelettaufnahmen vor allem des Schädels und der Wirbelsäule, Knochenszintigraphie, Knochenmarkspunktion und Nebennierenphlebographie vermögen zur Diagnostik beizutragen (4,25).

Eine entscheidende Bereicherung der diagnostischen Möglichkeiten stellt aber die Entdeckung der spezifischen sekretorischen Aktivität der malignen Sympathikustumoren dar (13,16,19,21); Neben den ausdifferenzierten adrenergen Neuronen und den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks synthetisieren und sezernieren auch die neoplastischen Sympathikuszellen Katecholamine.

Die Katecholamine

Nomenklatur:

Als Katecholamine bezeichnet man Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin (38). Es handelt sich um Derivate des Phenyläthylamins mit zwei Hydroxylgruppen am Benzolring.

Biosynthese:

Die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und die sympathischen Neurone enthalten die für die Biosynthese notwendigen Enzyme. Sympathische Ganglienzellen synthetisieren dabei Dopamin und Noradrenalin, die chromaffinen NNM-Zellen ca. $\frac{4}{5}$ Adrenalin und $\frac{1}{5}$ Noradrenalin sowie zusätzlich Dopamin (6,7,12,36,37). Die Biosynthese ist in Abb.2 dargestellt (14,28,31):

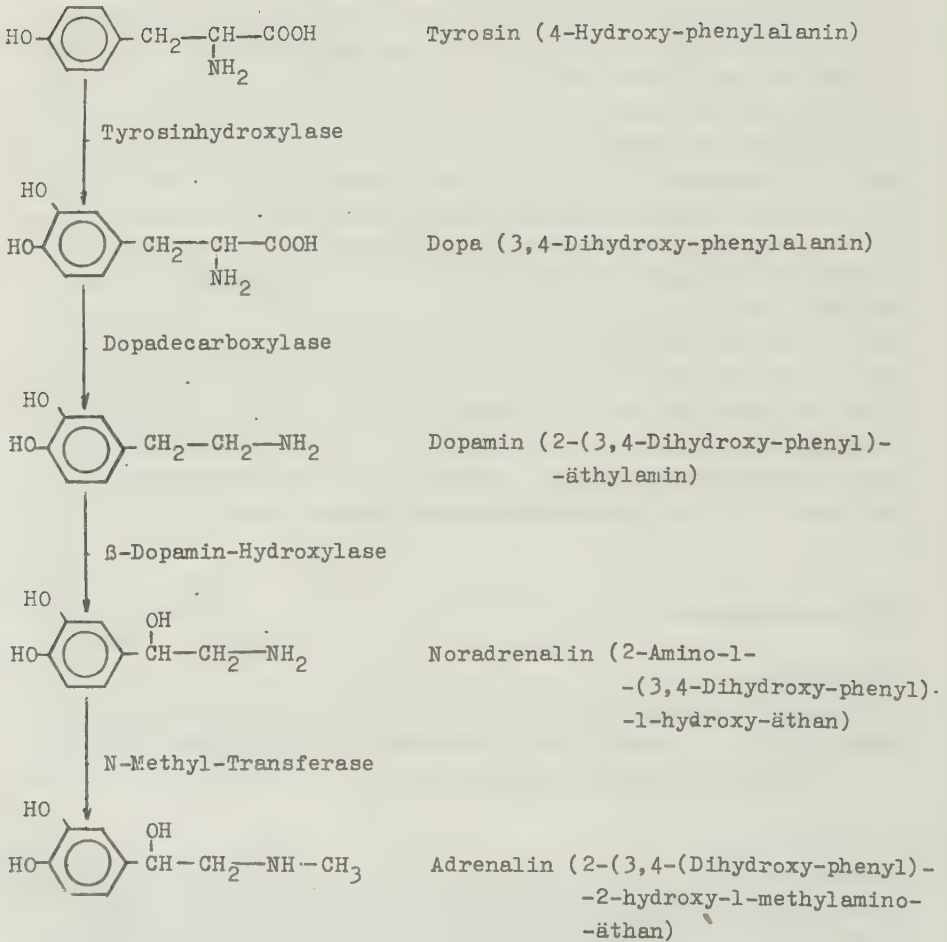


Abb.2: Schema der Biosynthese der Katecholamine (31).

Physiologische Freisetzung im Organismus:

Die synthetisierten Katecholamine werden in Granula im Komplex mit ATP in den chromaffinen Zellen u. sympathischen Neuronen gespeichert. Dopamin findet sich in den sympathischen Neuronen im Zytoplasma. Reizung der sympath. Nervenzellen führt zur Frei-

setzung in den postsynaptischen Spalt, wobei der größte Teil des Noradrenalins vom Neuron wieder aufgenommen wird. Ein kleiner Teil diffundiert in den intercellulären Raum ab, von wo es ins Blut gelangt. Nervale Reize über den Nervus splanchnicus, Acetylcholin, Insulin und Histamin bewirken die Ausschüttung der Katecholamine aus dem Nebennierenmark ins Blut. Die zirkulierenden Katecholamine werden teilweise von Geweben aufgenommen und gespeichert oder abgebaut (6,28,30,31,37).

Abbau und Ausscheidung der Katecholamine:

Die entscheidenden Schritte für den Abbau sind Methylierung und oxidative Desaminierung, katalysiert durch die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) und die Monoaminoxidase (MAO). Der Abbau erfolgt über verschiedene Wege und Metaboliten die in Abb.3 dargestellt sind: Die im Urin ausgeschiedenen Produkte sind eingeraht.

Katecholamine u. Metabolite liegen im Harn sowohl in freier Form, als auch mit Glucuron- oder Schwefelsäure konjugiert vor:

	<u>frei</u>	<u>konjugiert</u>
Adrenalin/Noradrenalin:	50 %	50 %
Metanephrin/Normetanephrin:	20 %	80 %

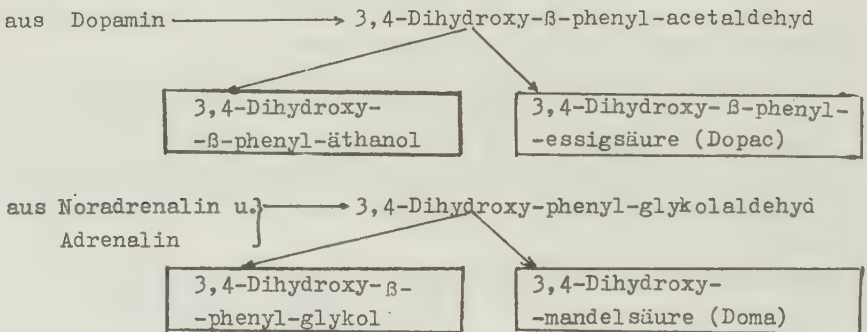
Tab.1: Verhältnis von freien zu konjugierten Katecholaminen und Metaboliten im Urin (44).

Nach WISSER (43) ist die Ausscheidungs menge der Katecholamine einer tageszeitlichen Rhythmik mit Tiefstwerten in den Nachtstunden unterworfen.

1. Bei alleinigem Abbau durch die COMT entsteht:



2. Bei alleinigem Abbau durch die MAO entsteht:



3. Bei Abbau (überwiegender Teil) durch COMT u. MAO entsteht:

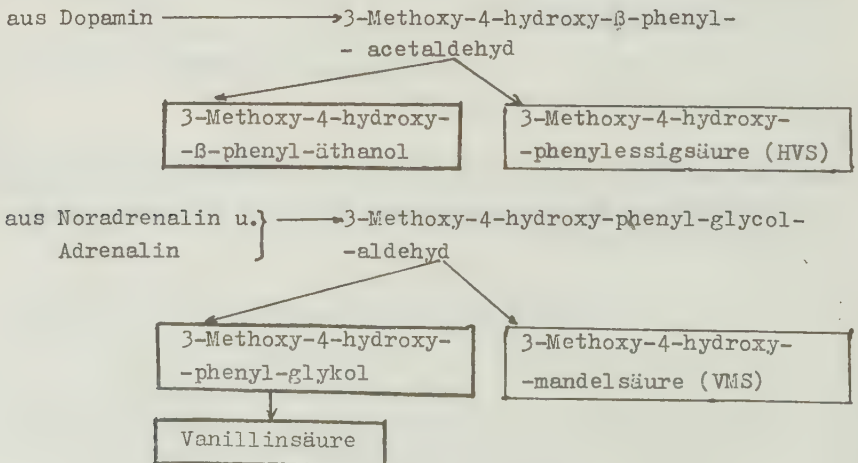


Abb.3: Abbau der Katecholamine, abgewandelt nach (6).
Die im Urin ausgeschiedenen Substanzen sind eingerahmt.

3. Katecholaminsekretion bei Neuroblastom

Mehrere Arbeiten(3,8,17-19,24,33,34,41) wiesen bei Neuroblastompatienten mit unterschiedlicher Häufigkeit eine erhöhte Ausscheidung von Katecholaminen und/oder deren Metaboliten im Urin nach (Tab.2).

H. KÄSER zeigte, daß die Dopaminausscheidung bei allen Patienten mit neurogenen malignen Sympathikustumoren erhöht ist, auch bei „ VMS- und HVS-stummen " Tumoren. Als Folge der Fähigkeit der neoplastischen Sympathikuszellen Katecholamine zu synthetisieren, scheinen alle (15,19) neurogenen malignen Sympathikustumoren sekretorisch aktiv zu sein. Zwischen dem Wachstum der Geschwulst und der Menge der im Urin ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte besteht Parallelität. Für die Verlaufskontrolle scheint die Dopaminausscheidung der empfindlichste Indikator zu sein, da sie sich nach erfolgreicher Behandlung als letztes Merkmal **normalisiert**, andererseits schon Wochen vor einem klinisch fassbaren Rezidiv wieder erhöht sein kann. (15)

Aufgrund der herausragenden Sensitivität der Dopaminausscheidung und der hohen Aussagekraft der Adrenalin-, Noradrenalin- und Metanephринаusscheidung im Urin bei Neuroblastom, sowie aus methodisch rationellen Überlegungen für die Routinediagnostik, erscheint es sinnvoll diese Parameter zur Diagnostik und Verlaufskontrolle der Neuroblastomerkrankung zu bestimmen.

In der Literatur sind nur wenige altersabhängige, zudem mit verschiedenen Methoden bestimmte, Richtwerte der Katecholamin- und Metabolitenausscheidung im Urin bei Kindern beschrieben: Tab.3 .

Katecholamine u. Metaboliten	Anzahl der Arbeiten	Literatur	Neuroblastom= patienten insgesamt	Anteil der Patienten mit erhöhter sekret. Aktivität in %
Dopamin	3	(17, 19, 34)	65	94 - 100 %
Adrenalin u. Noradrenalin	3	(3, 34, 41)	53	81 - 90 %
Metanephrine	3	(3, 8, 34)	74	86 - 95 %
HVS	7	(8, 17-19, 24, 33, 34)	280	53 - 100 %
VMS	9	(3, 8, 17-19, 24, 33, 34, 41)	382	67 - 100 %
Dopa	1	(34)	2	86 %
3-Methoxy-4-hydroxy- -phenyl-glykol	1	(8)	31	97 %

Tab. 2: Literaturübersicht über erhöhte Ausscheidung von Katecholaminen u. Metaboliten im
Urin bei Neuroblastom.

Autoren	Lit.	Anzahl d. Alter Probanden (Jahre)	Adrenalin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$]	Noradrenalin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$]	Dopamin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$]
RITZEL u. HUNZINGER	(26)	46	0-10	$\bar{x}$ (s) 9,2 (8,6)	19 (13)
VOORHESSE, M. J.	(40)	19	0-1	$\bar{x}$ (s) 1,3 (1,2)	10,6 (3,4)
		15	1-5	$\bar{x}$ (s) 3,2 (2,7)	18,8 (7,0)
		13	6-15	$\bar{x}$ (s) 4,8 (2,4)	37,4 (16,6)
MOYER, T. P. u. a.	(23)	0-1	Bereich	0-2,5	0-85
		1-2	Bereich	0-3,5	1-17
		2-4	Bereich	0-6,0	4-29
		4-7	Bereich	0,2-10	8-45
		7-10	Bereich	0,5-14	13-65
		10-15	Bereich	0,5-20	15-80

Tab. 3: In der Literatur angegebene mit unterschiedlichen Methoden bestimmte Ausscheidungs-
mengen an Katecholaminen im Urin bei Kindern (0-15 Jahre).

4. Ziel der vorliegenden Arbeit

Es sollen altersabhängige Richtwerte der Ausscheidung von Katecholaminen und deren Metaboliten im 24-Std.-Urin von Kleinkindern als Grundlage für die Neuroblastomdiagnostik ermittelt werden, indem aus einem definierten Kollektiv Meßwerte (Referenzwerte) der Ausscheidung bestimmt werden von:

- gesamtem Adrenalin
- gesamtem Noradrenalin
- Gesamtkatecholamin
- Metanephrinen
- freiem Dopamin
- gesamtem Dopamin

Leitgedanke soll dabei stets die Praktikabilität und Effizienz für die Diagnostik und Verlaufskontrolle der Neuroblastomerkrankung sein.

Weiterhin sollen altersabhängige Richtwerte der Katecholamin- und Metabolitenausscheidung pro Creatininausscheidung, pro Körpergewicht und pro Körperoberfläche, im 24-Std.-Urin bestimmt werden.

Die Messungen von Dopamin einerseits mit einem Spektralfluorometer, andererseits mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) sollen an einer Stichprobe verglichen werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Probandenkollektiv

Auswahl:

Von 131 Kindern im Alter vom Neugeborenen bis vor Vollendung des siebten Lebensjahrs wurden 24-Std.-Urin-Proben gesammelt. Die Alters- u. Geschlechtsverteilung ist in Tab.4 aufgeführt. Bei allen Kindern des dritten bis siebten Lebensjahrs und drei Kindern des zweiten Lebensjahrs handelt es sich um Kinder aus dem eigenen Bekanntenkreis und aus vier öffentlichen bzw. privaten Kindergärten in verschiedenen Regionen Süddeutschlands. Eine systematische Auswahl wurde insofern vermieden, als daß sämtliche von den Eltern zur Verfügung gestellten Kinder in die Studie einbezogen wurden, unabhängig vom Alter, Geschlecht, Ernährungszustand, geistiger Entwicklung sowie sozialer Herkunft. Kriterien der Auswahl stellte lediglich die genaue Befolgung der Sammel- u. Ernährungsvorschrift, sowie eine normale Körperverfassung der Kinder, welche mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens ermittelt wurde, dar (Vorschriften und Fragebogen im Anhang).

Vier Kinder des zweiten Lebensjahrs, sowie alle Kinder des ersten Lebensjahrs wurden in Kinderkliniken erfaßt, weil es bei „noch nicht sauberen“ Kindern außerordentlicher Sorgfalt bedarf 24-Std.-Urine korrekt zu sammeln. Es lag bei diesen Kindern weder ein Verdacht noch eine Manifestation einer malignen Erkrankung oder einer Erkrankung der Nebenniere vor.

2. Probengewinnung des 24-Std.-Urins

Ernährungsvorschrift für die Probanden (siehe Anhang):

1 Tag vor, sowie während der Sammelzeit mußte auf den Genuß verzichtet werden von:

- Bananen
- Kaffee
- schwarzen Tee
- Schokolade.

Alter	Anzahl insgesamt	♀	♂
7. Lebensjahr	12	6	6
6. Lebensjahr	29	16	13
5. Lebensjahr	21	8	13
4. Lebensjahr	21	8	13
3. Lebensjahr	14	4	10
2. Lebensjahr	7	2	5
Säuglinge, 29. Lebenstag bis 1 Jahr,	10	1	9
Neugeborene, 1. bis 28. Lebenstag,	7	1	6
Frühgeborene, (33.-37.SSW) 1. bis 7. Lebenstag,	10	1	9
Gesamtzahl	131	47	84

Tab.4: Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden.

Sammlung der Proben:

Die Gewinnung der Proben erfolgte gemäß der Sammelvorschrift (siehe Anhang).

Durch Vorlage von 10 ml 20% HCl ins dunkle Sammelgefäß überschreitet der pH des Urins während der Sammelzeit nicht pH 5, wodurch die Stabilität der Katecholamine gesichert wird.

Nach der Sammelzeit von 24 Std. wurde das Volumen des ausgeschiedenen Urins gemessen und anschließend ca. 50 ml der gut gemischten Gesamtmenge bei -20°C bis zur Analyse eingefroren.

Analytik der Katecholamine u. der Metaboliten

1. Prinzip der Abtrennung aus dem Urin (Abb. 4):

Die zu messenden Substanzen werden durch Adsorption an einen Kationenaustauscher der Fa. BIO-RAD, München, aus Urin vorgeeignet.

2. Prinzip der Messungen (Abb. 5):

1. Messung von A und NA im Eluat 1:

Zur differentiellen Bestimmung von A und NA wird die pH-Abhängigkeit der Oxidation mittels Kaliumhexacyanoferrat herangezogen. Nach Teilung des gut gemischten Eluats 1, wird je ein Teil durch Pufferzusatz auf pH 3,5 bzw. pH 6,5 eingestellt. Mittels Kaliumhexacyanoferrat erfolgt dann die Oxidation zum fluoreszierenden Adenochrom (3,5,6,-Trihydroxy-1-methyl-indol). Mit alkalischer Ascorbinsäure wird dieses stabilisiert und anschließend sofort im Fluorometer gemessen.

2. Messung von MN im Eluat 2:

Die Metanephrine werden mit Natrium-meta-perjodat zu Vanillin oxidiert und spektralphotometrisch gemessen.

3. Messung von Dg im Eluat 1 und von Df im Eluat 3:

a) im Fluorometer:

Nach Einstellung auf pH 7 durch Pufferzusatz wird Dopamin mit Natrium-meta-perjodat zum Adrenochrom oxidiert. Nach Reaktionsstopp mit alkalischer Natriumsulfitlg. und Stabilisierung sofortige Messung im Fluorometer.

b) mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Die gelösten Substanzen des Eluats werden mit Hilfe einer

Trennsäule voneinander getrennt und mittels UV-Detektor
fortlaufend gemessen.

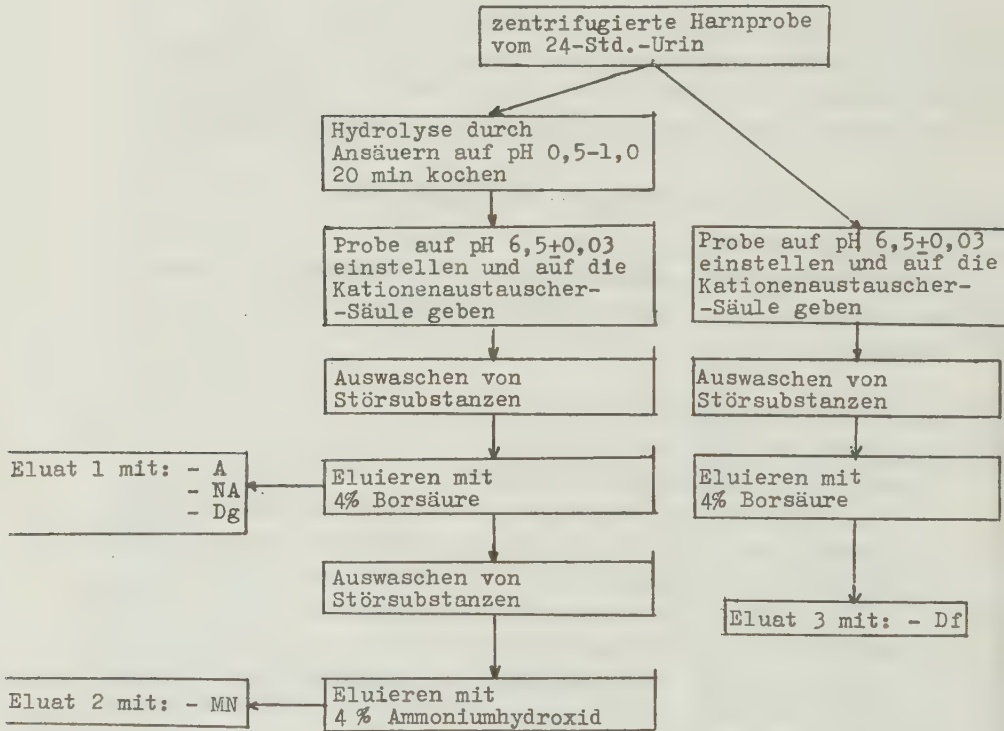
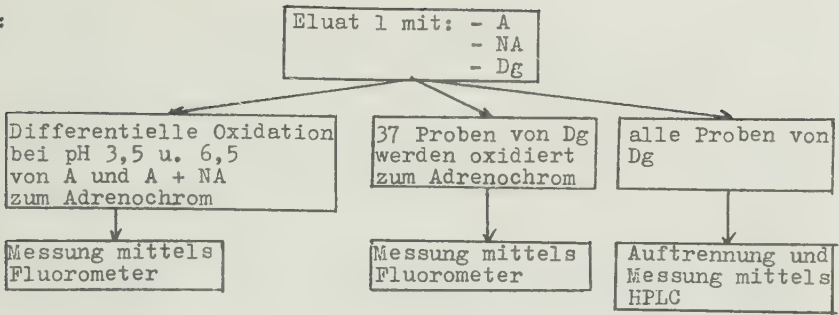
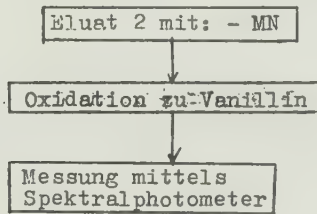


Abb.4: Prinzip der Abtrennung der Katecholamine u. Metaboliten aus dem Urin.

1.:



2.:



3.:

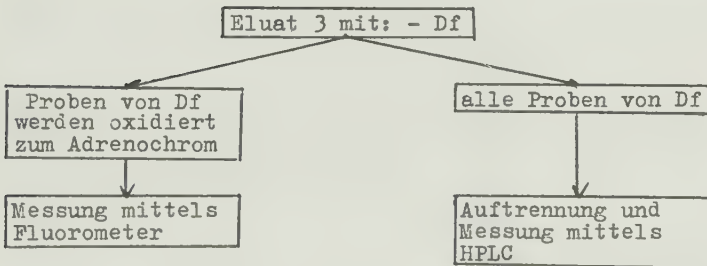


Abb.5: Prinzip der Messungen.

3.3. Analyse:

3.3.1. Isolierung der Eluate 1 - 3:

Geräte:

- Zentrifuge
- pH-Meter
- Zeituhr
- Titrator
- Präzisionswaage
- Mischer
- Wasserbad 100°C
- Wasserbad 0 - 5°C
- Reaktionsgefäße mit Ständer
- Zentrifugengefäße
- Säulenständer, BIO-RAD
- Meßkolben, Pipetten, Reagenzgläser

Reagenzien:

- Reagens A: 0,1 %ige Na₂-EDTA-Lsg. (2,686 mmol/l);
- Reagens B: 0,5 N Natriumhydroxid-Lsg. (0,5 mol/l);
- Reagens C: 4,0 %ige Borsäure-Lsg. (0,647 mol/l);
- Standard-Lsg. A: Adrenalin (100 µg/ml $\hat{=}$ 0,546 mmol/l)
in 1,0 %iger HCl (0,274 mol/l)
Lagerung bei +2-8°C;
BIO-RAD: Nr.825;
- Standard-Lsg.NA: Noradrenalin (100 µg/ml $\hat{=}$ 0,591 mmol/l)
in 1,0 %iger HCl (0,274 mol/l)
Lagerung bei +2-8°C;
BIO-RAD: Nr.827;
- Standard Dopamin: 3-Hydroxy-Thyramine HCl;
SIGMA Chemical Company St.Louis, USA:Nr.H8502
- Standard-Lsg.MN: Normetanephrin (100 µg/ml $\hat{=}$ 0,577 mmol/l)
in 1,0 %iger HCl (0,274 mol/l)
Lagerung bei +2-8°C;
BIO-RAD: Stock Solution 100 µg/l;
- Reagens D: 4,0 %ige Ammoniumhydroxid-Lsg.;
- 0,1 N Salzsäure;
- 6,0 N Salzsäure;
- Kationenaustauscher-Chromatographiesäulen, BIO-RAD;
- Kontrollurin KU: Lypocheck, Quantitative Control Urine I (Human)
Environmental Chemical Specialties Inc.
3700 East Miraloma Avenue
Anaheim, California 92807, USA,
Item No.: C-390-25
- Poolurin PU;
- Trägerurin TrU;

Vorbereitung der Standard-Arbeitslösungen:

- A-Standard-Arbeitslösung: ($1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 5,5 \mu\text{mol/l}$)
1,0 ml Standardlösung A und 4,0 ml 0,1 N Salzsäure in einen 100 ml Meßkolben pipettieren, mit dest. Wasser auffüllen, gut mischen.
Je 2,5 ml der A-Standard-Arbeitslösung in verschließbare Reagenzröhrchen abfüllen und bei -20°C bis zum Gebrauch einfrieren.
- NA-Standard-Arbeitslösung: ($1 \mu\text{g/ml} \hat{=} 5,9 \mu\text{mol/l}$)
1,0 ml Standardlösung NA und 4,0 ml 0,1 N Salzsäure in einen 100 ml Meßkolben pipettieren und mit dest. Wasser auffüllen, gut mischen.
Je 2,5 ml der NA-Standard-Arbeitslösung in verschließbare Reagenzröhrchen abfüllen und bei -20°C bis zum Gebrauch einfrieren.
- MN-Standard-Arbeitslösung: ($5 \mu\text{g/ml} \hat{=} 28,86 \mu\text{mol/l}$)
2,5 ml Standard-Lösung MN und 2,5 ml 0,1 N Salzsäure in einen 50 ml Meßkolben pipettieren und mit dest. Wasser auffüllen, gut mischen.
Je 1,5 ml der MN-Standard-Arbeitslösung in verschließbare Reagenzröhrchen abfüllen und bei -20°C bis zum Gebrauch einfrieren.
- D-Standard-Arbeitslösung: ($5 \mu\text{g/ml} \hat{=} 26,37 \mu\text{mol/l}$)
 - 1.) Stocklösung D: ($100 \mu\text{g/ml} \hat{=} 527,43 \mu\text{mol/l}$)
61,5 mg Standard Dopamin (3-Hydroxy-Thyramine-HCl) werden in einem 500 ml Meßkolben in 500 ml 0,1 N Salzsäure gelöst und gut gemischt.
 - 2.) D-Standard-Arbeitslösung: ($5 \mu\text{g/ml} \hat{=} 26,37 \mu\text{mol/l}$)
5 ml Stocklösung D in einen 100 ml Meßkolben pipettieren und mit 0,05 N Salzsäure auffüllen und gut mischen.
Je 2,5 ml D-Standard-Arbeitslösung in verschließbare Reagenzröhrchen abfüllen und bei -20°C bis zum Gebrauch einfrieren.

Herstellung von Kontrollurin, Poolurin und Trägerurin:

- Kontrollurin KU:
Die gefriergetrocknete Substanz wird in 25 ml 0,1 N HCl gelöst. Je 5,0 ml wird in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert.
- Poolurin PU und Trägerurin TrU:
3000 ml Urin einer gesunden Person wird mittels 25 %iger Ammoniumhydroxidlg. auf pH 10 zur Oxidation der freien Katecholamine alkalisiert und nach einer Stunde zur Stabilisierung mit 20 %iger Salzsäure auf pH 1 eingestellt.
Sofort nach dem Ansäuern werden 100 Portionen von jeweils 5,0 ml bis zur Analyse bei -20°C tiefgefroren: PU;
2500 ml werden nach dem Ansäuern bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Jeweils 5,0 ml davon werden als Trägerurin TrU verwendet.

3.3.1.1. Arbeitsschritte Eluat 1 (A, NA, Dg):

1. Ca. 15 ml von jeder Probanden-24-Std.-Urinprobe in gekennzeichneten Zentrifugengefäßen mit 3000 U/min 10 Minuten lang zentrifugieren.
2. Für TrU, A, NA, Dg, KU, PU, und jede Probe n ein verschließbares 50 ml Reaktionsgefäß kennzeichnen u. einpipettieren:
 - TrU: 5,0 ml Trägerurin;
 - A : 5,0 ml Trägerurin + 2,0 ml A-Standard-Arbeitslösung;
 - NA : 5,0 ml Trägerurin + 2,0 ml NA-Standard-Arbeitslösung;
 - Dg : 5,0 ml Trägerurin + 1,0 ml D-Standard-Arbeitslösung;
 - KU : 5,0 ml Kontrollurin;
 - PU : 5,0 ml Poolurin;
 - n : 5,0 ml zentrifugierte 24-Std.-Urinprobe;
3. Alle Urine mittels pH-Meter und 6 N Salzsäure auf pH 0,5 - 1,0 einstellen.
4. Alle Urine verschlossen exakt 20 Minuten im Wasserbad bei 100°C hydrolysieren.
5. Anschließend sofort alle Urine im kühlen Wasserbad rasch auf Raumtemperatur abkühlen.
6. Zu jedem Urin 15 ml Reagens A pipettieren u. gut mischen.
7. Alle Urine durch langsame Zugabe von Reagens B mit Hilfe von pH-Meter und Titrator auf exakt pH 6,5 $\pm$ 0,03 einstellen. (Auf keinen Fall übertitrieren !).
8. Für jeden Urin eine Ionenaustauschsäule vorbereiten: Harz der Säule durch Aufschütteln resuspendieren, absetzen lassen, Kappen u. Spitzen des Säulen entfernen und Säulen im Säulenständer vollständig auslaufen lassen.
9. Die Urine auf die entsprechende Säule bringen und vollständig durchlaufen lassen. Danach zweimal durch Auffüllen der Säule mit dest. Wasser nachwaschen. Diese Eluate verwerfen.
10. Jede Säule auf ein Reagensglas setzen und in jede jeweils 8,0 ml Reagens C pipettieren, Eluate 1 sammeln und jedes gut mischen.

Beachte: Die Analyse von Eluat 1 kann nach diesem Schritt unterbrochen werden. Die Proben können bis zu 96 Std. eingefroren aufbewahrt werden.

3.3.1.2. Arbeitsschritte Eluat 2 (MN):

Die Isolierung und Analyse von Eluat 2 muß sofort anschließend an die Isolierung von Eluat 1 erfolgen !

1. 5,0 ml Trägerurin und 1,0 ml MN-Standard-Arbeitslösung in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettieren (Interner Standard MN).
2. Mit dem internen Standard MN verfährt man wie beschrieben in 3.3.1.1. Unterpunkt 6. bis 9. .
3. Die Säulen von TrU, KU und n werden nach dem Gewinnen von Eluat 1 einmal mit dest. Wasser aufgefüllt u. gewaschen. Wascheluat verwerfen.
4. Die Säulen TrU, MN, KU, und n werden nun auf die entsprechenden Reagensgläser gesetzt und mit je 7,5 ml Reagens D eluiert: Eluat 2 : sofortige Analyse !

3.1.3. Arbeitsschritte Eluat 3 (Df):

1. Wie 3.3.1.1. Unterpunkt 1.
2. Für TrUf, Df, KUF, PUF und jede Probe n ein 50 ml Reaktionsgefäß kennzeichnen und pipettieren:
 - TrUf: 5,0 ml Trägerurin;
 - Df : 5,0 ml Trägerurin + 1,0 ml D-Standard-Arbeitslösung;
 - KUF : 5,0 ml Kontrollurin +
+ (als Aufstockung) 200 µl D-Standard-Arbeitslösung;
 - PUF : 5,0 ml Poolurin
 - n : 5,0 ml zentrifugierte 24-Std.-Urin-Probe;
3. Die Urine werden nicht hydrolysiert !
Mit allen Urinen verfahren wie beschrieben in 3.3.1.1., Unterpunkt 6. bis 10.: Eluat 3;

3.2. Messung der Eluate:

3.2.1. Messung von A und NA mittels Fluorometer:

Geräte:

- Spektralfluorometer: Spectrofluorometer Model 801
FARRAND OPTICAL Co. Inc.
117 Wall Street
Valhalla, New York, USA
 - Anregungswellenlänge: 405 nm;
 - Emissionswellenlänge: 520 nm;
- Quarzküvetten
- Stoppuhr
- Präzisionswaage
- Mischer
- Pipetten, Reagenzgläser

Reagenzien:

- Reagens 1: Phosphat-Puffer (1,0 mol/l, pH 6,5)
- Reagens 2: 0,25 %ige Zinksulfatlösung (8,690 mmol/l)
- Reagens 3: 0,25 %ige Kaliumhexacyanoferratlg. (7,590 mmol/l)
- Reagens 4: Ascorbinsäure, kristallin
- Reagens 5: 20 %ige Natriumhydroxidlösung (5,0 mol/l)
- Reagens 6: Acetat-Puffer (1,0 mol/l, pH 3,5)
- Reagens C: 4 %ige Borsäurelösung (0,647 mol/l)

Arbeitsschritte:

1. Für die Messung von A bei pH 3,5 je Eluat 1 von TrU, A, NA, KU, und n jeweils 1 Reagenzglas für den Leerwert (lw) und den Hauptwert (hw) vorbereiten. Zusätzlich ein Reagenzglas für den Reagenzleerwert (RLw).
Für die Messung von A+NA bei pH 6,5 je Eluat 1 von TrU, A, NA, KU und n jeweils 1 Reagenzglas für den Hauptwert (Hw) und 1 Reagenzglas für den Leerwert (Lw) vorbereiten.
2. In jedes Reagenzglas der 4 Reihen von lw, hw, Lw u. Hw je 1,0 ml zugehöriges Eluat 1 pipettieren.
In das Reagenzglas RLw pipettiert man 1,0 ml Reagens C und 1 Tropfen Reagens 5.
3. Puffer Zugabe:
 - a) jeweils 500 µl Reagens 6 in hw u. lw;
 - b) jeweils 500 µl Reagens 1 in Hw u. Lw;
 - c) 500 µl von Reagens 6 oder Reagens 1 in RLw;
4. In hw, lw, Hw, Lw und RLw je 100 µl Reagens 2 pipettieren, gut mischen.
5. Ansetzen von alkalischer Ascorbinsäurelösung:
2 %ige Ascorbinsäurelösung (0,114 mol/l): 1,0 g Reagens 4 wird in 50 ml dest. Wasser gelöst.
Alkalische Ascorbinsäurelösung: die 2 %ige Ascorbinsäurelg. wird mit Reagens 5 im Volumenverhältnis 2 : 9 gemischt (2 Volumenanteile 2 %ige Ascorbinsäurelg. + 9 Volumenanteile Reagens 5).
Beachte: Diese alkalische Ascorbinsäure ist nur 20 min stabil und muß daher stets frisch angesetzt werden!
6. In alle Reagenzgläser mit lw und Lw sowie in RLw 500 µl alkal. Ascorbinsäure und anschließend 100 µl Reagens 3 pipettieren, gut mischen.
7. Beachte: Schritt 7 muß in genauen Zeitabständen pipettiert werden (Stoppuhr): so können mit einem Intervall von 10 s maximal 12 Proben innerhalb der für die Oxidation vorgeschriebenen 2 Minuten oxidiert werden!

Mit Hw (pH 6,5) beginnen:

Jeweils im gleichen Zeitintervall (10 s) 100 µl Reagens 3 in jeden Hw pipettieren, gut mischen.
Genau 2 Minuten nach Zugabe von Reagens 3 im gleichen Zeitintervall je 500 µl alkalische Ascorbinsäurelösung in jeden Hw pipettieren, gut mischen.

Das Reaktionsprodukt 3,5,6-Trihydroxy-1-methyl-indol ist nur 20 Minuten lang stabil:

Die fluorometrische Messung muß deshalb innerhalb dieser 20 Minuten erfolgen !

Mit lw anschließend analog verfahren.

8. Im Fluorometer werden die Proben unter Verwendung von Quarzküvetten gemessen.

Wellenlängen: - Anregung: 405 nm
- Emission: 520 nm

9. Zu Beginn der Messung wird mit Hilfe von RLw der Nullwert am Fluorometer geeicht.
Die Spreizung des Fluorometers erfolgt mit Hw des Adrenalinstandards.

Alle gemessenen Werte Hw, Lw, hw, lw, werden in einem Protokoll festgehalten als Grundlage für die Berechnung von A, NA und GK.

Berechnung von A, NA, GK;

1. Die relativen Netto-Fluoreszenzwerte erhält man durch Subtraktion von: Hw - Lw

$$hw - lw$$

2. Es muß berücksichtigt werden, daß der für die Internen Standards A und NA verwendete Trägerurin eine Restkonzentration Katecholamine enthält:

Um die korrigierten Standardwerte zu erhalten wird der relative Netto-Fluoreszenzwert des Trägerurins TrU von den relativen Netto-Fluoreszenzwerten der Standards A und NA subtrahiert:

$$- A_{6,5}(\text{korr.}) = \frac{\text{rel. Netto-Fluoreszenzwert des Standards A}}{\text{rel. Netto-Fluoreszenzwert des TrU}} \\ (\text{ bei pH 6,5; } \pm 0,5 \mu\text{g A})$$

$$- A_{3,5}(\text{korr.}) = \frac{\text{rel. Netto-Fluoreszenzwert des Standards A}}{\text{rel. Netto-Fluoreszenzwert des TrU}} \\ (\text{ bei pH 3,5; } \pm 0,5 \mu\text{g A})$$

$$- NA_{6,5}(\text{korr.}) = \frac{\text{rel. Netto-Fluoreszenzwert des Standards NA}}{\text{rel. Netto-Fluoreszenzwert des TrU}} \\ (\text{ bei pH 6,5; } \pm 0,5 \mu\text{g NA})$$

$$- P_{6,5} = \text{rel. Netto-Fluoreszenzwert der Probe bei pH 6,5}$$

$$- P_{3,5} = \text{rel. Netto-Fluoreszenzwert der Probe bei pH 3,5}$$

3. Die AdrenalinKonzentration in der 24-Std.-Urinprobe wird mit Gleichung I berechnet:

$$\mu\text{g Adrenalin}/24 \text{ h} = \frac{P_{3,5}}{A_{3,5} \times 2,5 \text{ ml}} \times 24\text{-Std.-Urinvolumen} [\text{ml}]$$

4. Die NoradrenalinKonzentration in der 24.-Std.-Urinprobe wird mit Gleichung II berechnet:

$$\mu\text{g Noradrenalin}/24 \text{ h} = \frac{P_{6,5} - \frac{A_{6,5}}{A_{3,5}} \times P_{3,5}}{NA_{6,5} \times 2,5 \text{ ml}} \times 24\text{-Std.-Urinvol.} [\text{ml}]$$

5. Die Gesamt-Katecholaminkonzentration in der 24.-Std.-Urinprobe wird mit Gleichung III berechnet:

$$\mu\text{g Gesamt-Katecholamine} = \mu\text{g Adrenalin}/24 \text{ h} + \mu\text{g Noradrenalin}/24 \text{ h}$$

Störfaktoren:

- a) durch Nahrungsmittel: - Bananen (11)
- b) durch Medikamente:
 - α -Methyl-Dopa: die Medikation sollte 3-4 Tage vor der Harnsammlung abgesetzt werden;
 - Monoaminoxidasehemmer;
 - Labetolol;
 - Dimetinden;
- c) große körperliche Anstrengung des Patienten kurz vor der Harnsammlung

2.2. Messung von MN mittels Spektralphotometer

Geräte: - Spektralphotometer Zeiss Typ PM 4

Carl Zeiss, West Germany

- benützte Wellenlängen: a) 360 nm (Meßwerte)
- b) 350 nm (Störsubstanzen)

- Küvetten
- Stoppuhr
- Präzisionswaage
- Mischer
- Pipetten, Reagenzgläser

Reagenzien:

- Reagens 7: Natrium-meta-perjodat kristallin
- Reagens 8: Natrium-meta-bisulfit kristallin
- Reagens D: 4 %ige Ammoniumhydroxidlösung

Arbeitsschritte

1. Je Eluat 2 von TrU, MN, KU und n ein Reagenzglas für den Hauptwert Hw und den Leerwert Lw, sowie ein Reagenzglas für den Reagenzleerwert RLw vorbereiten.
2. In die Reagenzgläser für Hw und Lw je 3,0 ml Eluat 2 und in RLw 3,0 ml Reagens D pipettieren.
3. Ansetzen der Arbeitslösungen:
Beachte: Die Arbeitslösungen 7 und 8 müssen frisch angesetzt werden!
 - a) Arbeitslösung 7: 1,0 g Reagens 7 wird in 50 ml dest. Wasser gelöst zur 2 %igen Lösung (93,506 mmol/l)
 - b) Arbeitslösung 8: 1,0 g Reagens 8 wird in 10 ml dest. Wasser gelöst zur 10 %igen Lösung (0,526 mol/l)
4. In alle Lw zuerst 100 µl Arbeitslösung 8 pipettieren, gut mischen.
Anschließend in alle Lw 100 µl Arbeitslösung 7 pipettieren und gut mischen.
5. Beachte: Schritt 5 muß in genauen Zeitabständen pipettiert werden (Stoppuhr): so können mit einem Intervall von 10 s maximal 12 Proben innerhalb der für die Oxidation vorgeschriebenen 2 Minuten oxidiert werden.

In alle Reagenzgläser Hw sowie in RLw jeweils im gleichen Zeitintervall von 10 s 100 µl Arbeitslösung 7 pipettieren und gut mischen.

Nach exakt 2 min im gleichen Zeitintervall jeweils 100 µl Arbeitslösung 8 dazu pipettieren und gut mischen.

6. Einstellung des Nullpunkts am Spektralphotometer mit RLW.
Messung aller Hauptwerte Hw und Leerwerte Lw zuerst bei 360 nm.

Anschließend werden alle Hw und Lw bei 350 nm gemessen.

Beachte: Sollten die Meßwerte bei 360 nm weniger als die Hälfte der Meßwerte bei 350 nm betragen, so weist dies auf Störsubstanzen in der Probe hin !

Alle Meßwerte im Protokoll festhalten.

. Berechnung von MN;

1. Die effektiven Extinktionswerte erhält man durch Substraktion:

$$E(\text{eff.}) = \text{Extinktionswert } Hw_{360 \text{ nm}} - \text{Extinktionswert } Lw_{360 \text{ nm}}$$

2. Es muß berücksichtigt werden, daß der für den Internen Standard MN verwendete Trägerurin TrU eine Restmenge an Metanephrenen enthält:

Um den korrigierten Standardwert zu erhalten wird der effektive Extinktionswert von TrU vom effektiven Extinktionswert des Int.Standards MN subtrahiert:

$$E_{MN}(\text{korr.}) = E(\text{eff.})_{MN} - E(\text{eff.})_{TrU}$$

3. Die metanephrenkonzentration in der 24-Std.-Urinprobe wird mit Gleichung IV berechnet:

$$\text{mg Metanephrene/24 h} = \frac{E(\text{eff.})_n \times 1,0}{E_{MN}(\text{korr.}) \times 1000} \times 24\text{-Std. Urinvolumen in ml;}$$

Störfaktoren:

- a) durch Nahrungsmittel: - Bananen (11)
- b) Verschiedene Röntgenkontrastmittel können zu erhöhten oder erniedrigten Werten führen (5).
- c) - Methyl-Dopa;
- Methyl-Glucamin; (23)

3.2.3. Messung von Dg (Eluat 1) und von Df (Eluat 3) mittels Spektralfluorometer

Geräte: - Spektralfluorometer

Anregungswellenlänge: 325 nm

Emissionswellenlänge: 405 nm

- Quarzküvetten
- Stoppuhr
- Präzisionswaage

- pH-Meter
- Mischer
- Meßkolben, Pipetten, Reagenzgläser

Reagenzien:

- Reagens C : 4 %ige Borsäurelösung
- Reagens 9 : 70 %iger Äthanol
- Reagens 10: KH_2PO_4 kristallin
- Reagens 11: Citrat-Monohydrat kristallin
- Reagens 5 : 5,0 N Natriumhydroxid
- Reagens 12: 1,0 N Natriumhydroxid
- Reagens 13: 3,0 M Phosphorsäure
- Reagens 14: 5,0 N Salzsäure
- Reagens 7 : Natrium-meta-perjodat kristallin
- Reagens 15: Natriumsulfit kristallin

Arbeitsschritte:

Prinzipiell unterscheidet sich die Messung von Dg und Df nicht: Dg wird gemessen im Eluat 1 aus hydrolysiertem Harn, Df im Eluat 3 aus unhydrolysiertem Harn.

1. Je Eluat von TrU, D, KU, PU, und n ein Reagenzglas für den Hauptwert Hw und den Leerwert Lw, sowie ein Reagenzglas für den Reagenzleerwert RLw vorbereiten.
2. In Hw und Lw jeweils 1,0 ml Eluat, in RLw 1,0 ml Reagens C pipettieren.
3. In Hw, Lw, RLw jeweils 50 μl Reagens 9 pipettieren.
4. Ansetzen der Arbeitslösungen:
 - a) Arbeitslösung 10: Phosphatpuffer pH 7,0.
6,8 g Reagens 10 in 50 ml dest. Wasser lösen, mit Reagens 12 auf pH 7,0 einstellen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.
 - b) Arbeitslösung 11: Citratpuffer pH 4,0.
10,5 g Reagens 11 in 50 ml dest. Wasser lösen, mit Reagens 5 auf pH 4,0 einstellen und mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen.
5. In Hw, Lw, RLw je 500 μl 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 pipettieren.
6. Ansetzen der Arbeitslösungen:
 - a) Arbeitslösung 9 : Natriumperjodatlg: 50,0 mg Reagens 7 in 10,0 ml dest. Wasser lösen.
 - b) Arbeitslösung 15: Alkal.Natriumsulfitlg: 1,5 g Reagens 15 in 5,0 ml dest. Wasser lösen und auf 50 ml mit Reagens 5 auffüllen.

Beachte: Arbeitslösungen 9 und 15 erst kurz vor Gebrauch ansetzen.

7. Beachte:

Wegen Zeitabhängigkeit der folgenden Schritte sind Hauptwert und zugehöriger Leerwert gleichzeitig zu behandeln.

Schritt 7 muß in gleichen Zeitintervallen durchgeführt werden (Stoppuhr verwenden): So können in einem Intervall von 10 s maximal 6 Proben innerhalb der für die Oxidation erforderlichen Zeit von 1 min oxidiert werden:

In jeweils gleichen Zeitintervallen (10 s) pipettieren:

100 µl Arbeitslösung 9 in Hw, 100 µl dest. Wasser in Lw, und 100 µl Arbeitslösung 9 in RLw, gut mischen.

Nach exakt 1 Minute im gleichen Zeitintervall jeweils 500 µl Arbeitslösung 15 in Hw, Lw und RLw pipettieren, gut mischen.

8. Sofort anschließend folgende Reagenzien nacheinander in 1 Reagenzglas (Hw) dazu geben, dann Lw pipettieren, ebenso RLw:

- 500 µl Arbeitslösung 11;

- 850 µl Reagens 13;

- 1,5 ml Reagens 14;

Gut mischen.

9. Anschließend Messung von Hw und Lw mittels Spektralfluorometer unter Verwendung von Quarzküvetten.

Wellenlängen: - Anregung: 325 nm

- Emission: 405 nm

Zu Beginn der Messung wird mit Hilfe von RLw der Nullwert am Fluorometer geeicht.

Die gemessenen Werte für Hw und Lw werden im Protokoll festgehalten.

Berechnung von Df bzw. Dg:

1. Die relativen Netto-Fluoreszenzwerte erhält man durch Subtraktion von: Hw - Lw

2. Es muß berücksichtigt werden, daß der für die internen Standards Df bzw. Dg verwendete Trägerurin eine Restkonzentration an Dopamin enthält:

Um den korrigierten Standardwert zu erhalten wird der relative Netto-Fluoreszenzwert des TrU von dem relativen Netto-Fluoreszenzwert des Standards Df bzw. Dg subtrahiert:

- Df bzw. Dg = rel. Netto-Fluoreszenzwert Standard Df bzw. Dg
(korr.) -

rel. Netto-Fluoreszenzwert TrU

($\hat{=}$ 1,0 µg Dopamin)

- Pf bzw. Pg = rel. Netto-Fluoreszenzwert der Probe;

3. Die Dopaminkonzentration in der 24-Std.-Urinprobe wird mit Gleichung V berechnet:

$$\mu\text{g Dopamin}/24 \text{ h} \approx \frac{\text{Pf bzw. Pg}}{\text{Df} \cdot x 1,0[\text{ml}] \text{ (bzw. Dg)}} \times 24\text{-Std.-Urinvolumen} [\text{ml}]$$

Störfaktoren:

- α - Methyl-Dopa: die Medikation sollte 3-4 Tage vor der Harnsammlung abgesetzt werden.
- Monoaminoxidasehemmer;

- 2.4. Messung von Dg (Eluat 1) und von Df (Eluat 3) mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Geräte:

- System Fa. WATERS, Königstein, Taunus
- Chromatograph: - Pumpe M 45
- automat. Probeninjektor WISP 710A
- UV-Detektor M 440
- Trennsäule μ BONDAPAK (WATERS)

Auftrennung der Eluate:

Als Trennsäule wurden zwei μ BONDAPAK (WATERS) - Säulen hintereinandergeschaltet. Das Fließmittel, H_3PO_4 7 mmol/l, wurde mit einer Geschwindigkeit von 2,0 ml/min gepumpt. Das Injektionsvolumen betrug 100 μ l. Die Messung erfolgte bei der Wellenlänge von 280 nm. Die Aufzeichnung der Meßwerte erfolgte fortlaufend mit Hilfe eines Schreibers.

Auswertung:

Die Peakhöhe des Dopamins in den Eluaten 1 bzw. 3 wurden gemessen und die unbekannte Dopaminkonzentration über die Peakhöhe und bekannte Dopaminkonzentration des Standards Dg bzw. Df berechnet. Dabei muß aber die Restkonzentration an Dopamin im für den Internen Standard Dg/Df verwendeten TrU berücksichtigt werden:

$$- \text{Peak Std.}_{\text{korr.}} = \text{Peak Std.}_{\text{gemessen}} - \text{Peak TrU}_{\text{gemessen}} ;$$

Die Dopaminkonzentration der Proben n berechnet sich dann nach Gleichung VI:

$$\mu\text{g Dopamin} \approx \frac{1000[\mu\text{g}]}{\text{Peak Std.}_{\text{korr.}}[\text{mm}]} \times \text{Peak n}[\text{mm}]$$

Meßmerkmale:

- Die Retentionszeit des Dopamins betrug ca. 9 Minuten;
- Die Nachweisgrenze lag bei 33 $\mu\text{g/l}$;

Störfaktoren:

Während der gesamten Messungen wurde kein mit dem Dopamin-peak interferierender Störfaktor festgestellt.

4. Qualitätskontrolle:

- Die Qualitätskontrolle der Bestimmungen von A, NA und MN erfolgte mittels Kontrollurin KU:

	A, NA,	MN
$\bar{x}$	268,6	0,488
s	27,1	0,091
V	10,1 %	18,7 %

Die qualitativen Anforderungen wurden erfüllt.

- Zur Präzisionskontrolle der Bestimmung von Dg und Df wurde Kontrollurin KU und Poolurin PU verwendet:

a) Kontrollurin KU:

Um die Dopaminkonzentration in KU auf den Konzentrationsbereich von Df der Probandenurine einzustellen, wurde der Kontrollurin für die Bestimmung von Df aufgestockt:

$KU_f = 5,0 \text{ ml KU} + 200 \mu\text{l D-Standard-Arbeitslösung};$
 $KU_g = 5,0 \text{ ml KU};$

- b) Zusätzlich wurde zur Präzisionskontrolle ein selbst angesetzter Poolurin PU mitbestimmt:

$PU_f = 5,0 \text{ ml PU};$

$PU_g = 5,0 \text{ ml PU};$

	Df (KU_f)	Dg (KU_g)	Df (PU)	Dg (PU)
$\bar{x}$	313,8	581,5	213,3	477,1
s	39,6	91,8	18,2	71,1
V	12,6 %	15,8 %	8,5 %	14,9 %

Die qualitativen Anforderungen wurden erfüllt.

5. Messungen der Bezugsgrößen:

- a) Gesamtvolumen des 24-Std.-Urins in ml:

Die Messung erfolgte mit einem gläsernen 500 bzw. 1000 ml Meßzylinder.

- b) Gewicht und Körperlänge der Kinder wurden am Tag der 24-Std.-Urinsammlung bestimmt.

- c) Die Berechnung der Körperoberfläche erfolgte nach der Formel für die Körperoberfläche bei Kindern nach Du Bois und Du Bois (6):

$$O = G^{0,425} \times H^{0,725} \times 71,84 ;$$

O = Körperoberfläche in cm^2 ,

G = Körpergewicht in kg,

H = Körperlänge in cm,

- d) Konzentration von Creatinin in der 24-Std.-Urinprobe:

Die Messung erfolgte mittels des kontinuierlichen Analysators Technicon TQC SMA II der Technicon Instruments Corporation, Tarrytown, New York, USA.

Die Bestimmung erfolgte in zentrifugiertem unhydrolysiertem Harn.

6. Methodik der Auswertung

- 6.1. Die altersabhängigen Spannweiten der Bezugsgrößen wurden bestimmt und in Tabelle 5 zusammengefaßt.
- 6.2. Die Bestimmung von Perzentilen über die Ausscheidungsmengen von A, NA, GK, MN, Df und Dg in den Altersgruppen nach Tabelle 4 erfolgte graphisch (Beispiel: Abb. 23, Anhang). Die Meßwerte jeder Altersgruppe wurden ihrer Größe nach geordnet und jedem sein Prozentrang zugeordnet. Mit Hilfe eines Wahrscheinlichkeitsnetzes mit den Ausscheidungsmengen als Abszisse und den Prozenträngen ($\hat{=}$ Perzentilen) als Ordinate, wurde den Meßwerten eine stétige Kurve angenähert und mit deren Hilfe auf die Ausscheidungsmengen gefragter Perzentilen interpoliert.
Nach SACHS (27) wurde der Median $\tilde{x}$ mit 95 % - Vertrauensbereich bestimmt.
- 6.3. Die Ausscheidungsmengen von GK, MN und Df pro zugehöriger Creatininausscheidung, pro Körpergewicht und pro Körperoberfläche wurden berechnet und entsprechend 6.2. ausgewertet.
- 6.4. Der Vergleich der Messungen von Df und Dg, einerseits mit einem Spektralfluorometer und andererseits mittels HPLC, wurde anhand einer Stichprobe (n=22) unter Verwendung des t-Test für paarweise angeordnete Meßwerte (27) und durch Prüfung der Korrelation (27) durchgeführt.

E R G E B N I S S E und D I S K U S S I O N

1. Altersabhängige Spannweiten der Bezugsgrößen im Probandenkollektiv:

Alter	V [ml]	G [kg]	H [cm]	O [m ²]	C/24h [mg/24h]
7.Lj.	300-900	17,00-25,50	114-129	0,7605-0,9537	339,30-546,00
6.Lj.	219-782	15,00-30,00	105-124	0,6858-0,9689	223,26-616,98
5.Lj.	248-751	12,00-20,00	96-115	0,5652-0,8004	177,32-403,65
4.Lj.	215-890	12,00-18,00	93-112	0,5694-0,7508	89,44-340,34
3.Lj.	212-856	12,00-16,00	86-110	0,5350-0,7049	96,72-285,27
2.Lj.	130-575	8,55-12,90	71- 93	0,4136-0,5673	74,88-187,80
Säugl. 29.Tag -1.Lj.	250-620	3,39-10,42	39- 76	0,1891-0,4434	19,50-136,50
Neug.	68-315	2,70- 4,18	46- 58	0,1759-0,2505	19,89- 61,43
Frühg. 1.-7. Tag	14-300	1,25- 3,75	40- 52	0,1146-0,2210	8,84- 38,77

Tab.5: Altersabhängige Spannweiten im Probandenkollektiv von:

- Volumen des 24-Std.-Urins V
- Körpergewicht der Probanden am Sammeltag G
- Körpergröße der Probanden am Sammeltag H
- Körperoberfläche d. Probanden am Sammeltag O
- Creatinin im 24-Std.-Urin C/24h

2. Graphische Darstellung der altersabhängigen Spannweite der Referenzwerte und der altersabhängigen 50 %- und 95 %-Perzentilen der Ausscheidung der gemessenen Substanzen.

2.1. Ausscheidung im 24-Std.-Urin:

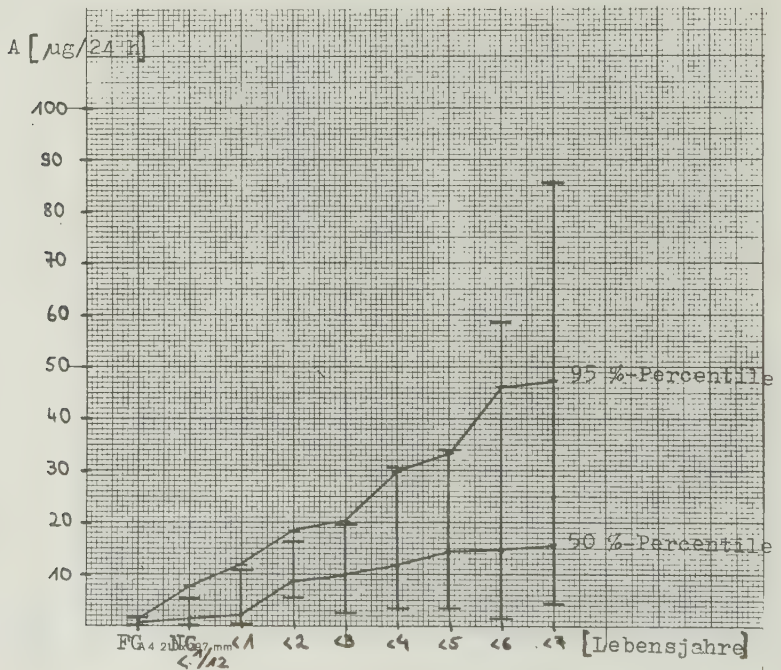


Abb.6: altersabhängige Adrenalinausscheidung im 24-Std.-Urin.

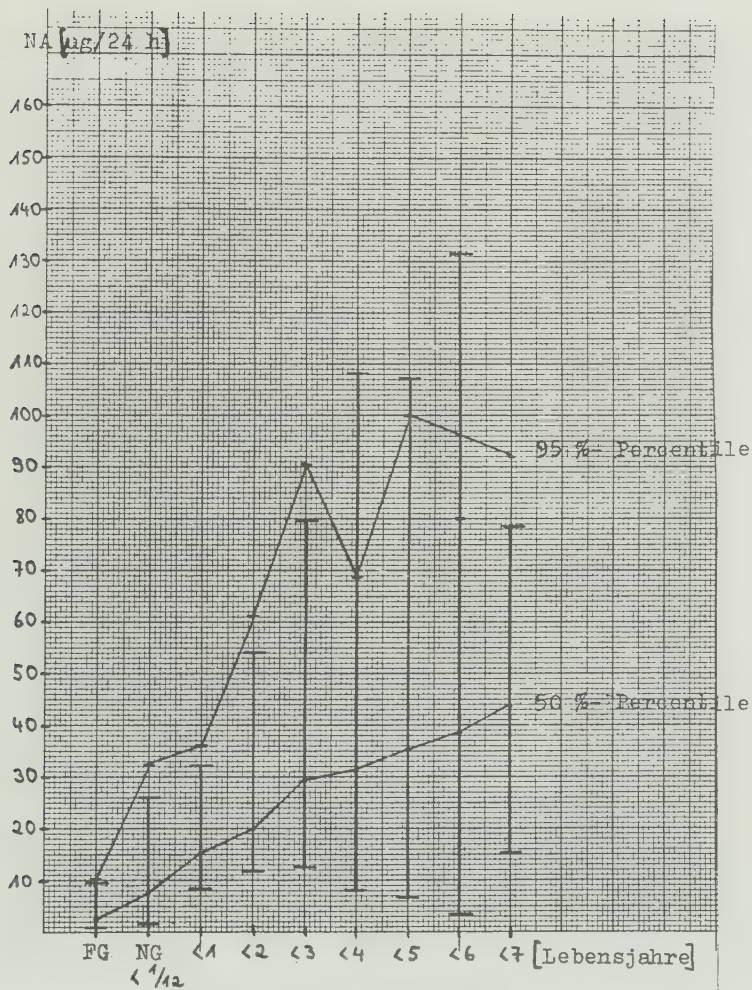


Abb.7: altersabhängige Noradrenalin-ausscheidung im 24-Std.-Urin.

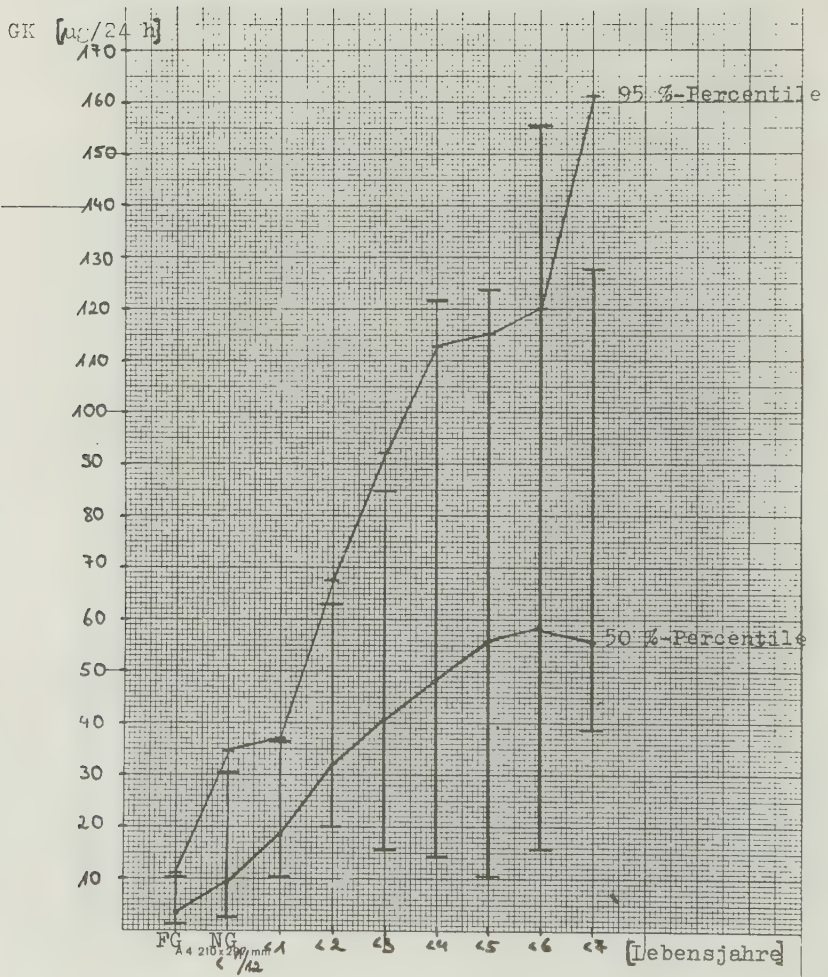


Abb.8: altersabhängige Gesamtkatecholaminausscheidung im 24-Std.-Urin.

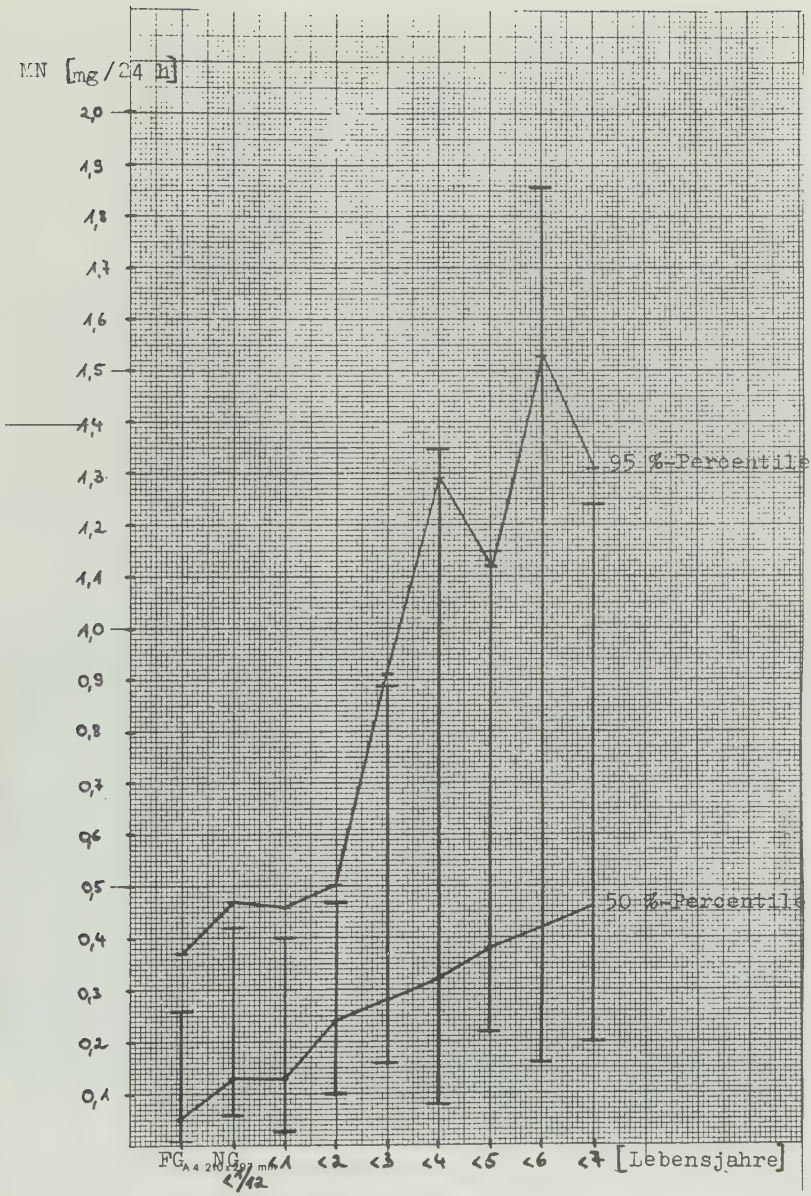


Abb.9: altersabhängige Metanephrinausscheidung im 24-Std.-Urin.

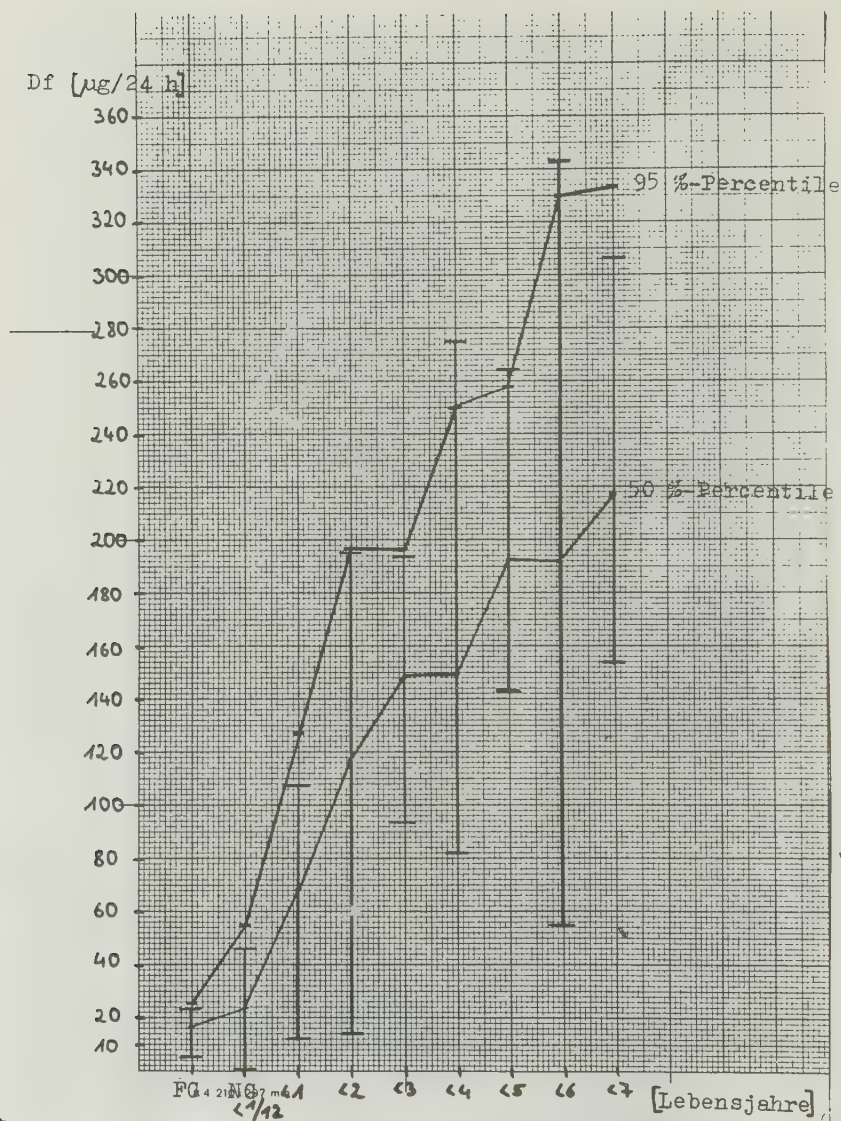


Abb.10: altersabhängige Ausscheidung von freiem Dopamin im 24-Std.-Urin.

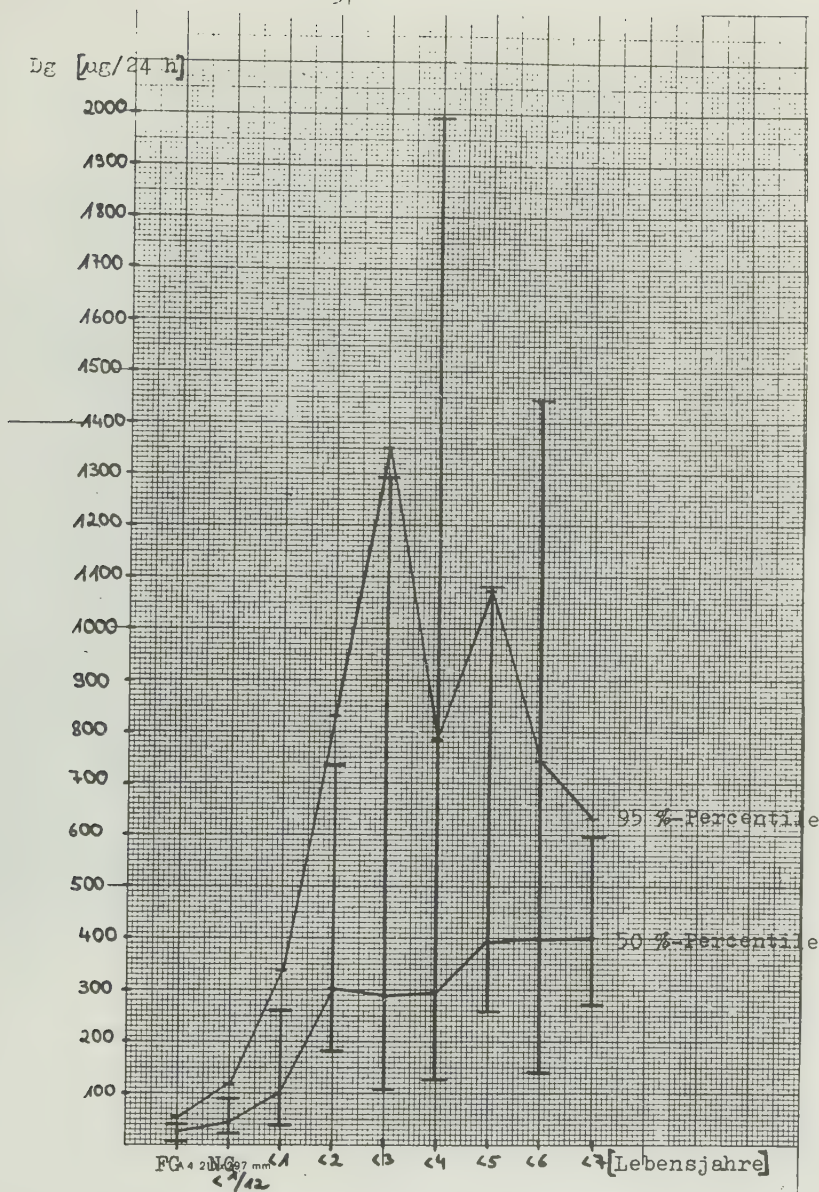


Abb.11: altersabhängige Ausscheidung von gesamtem Dopamin im 24-Std.-Urin.

2.2. Ausscheidung im 24-Std.-Urin pro Creatinin:

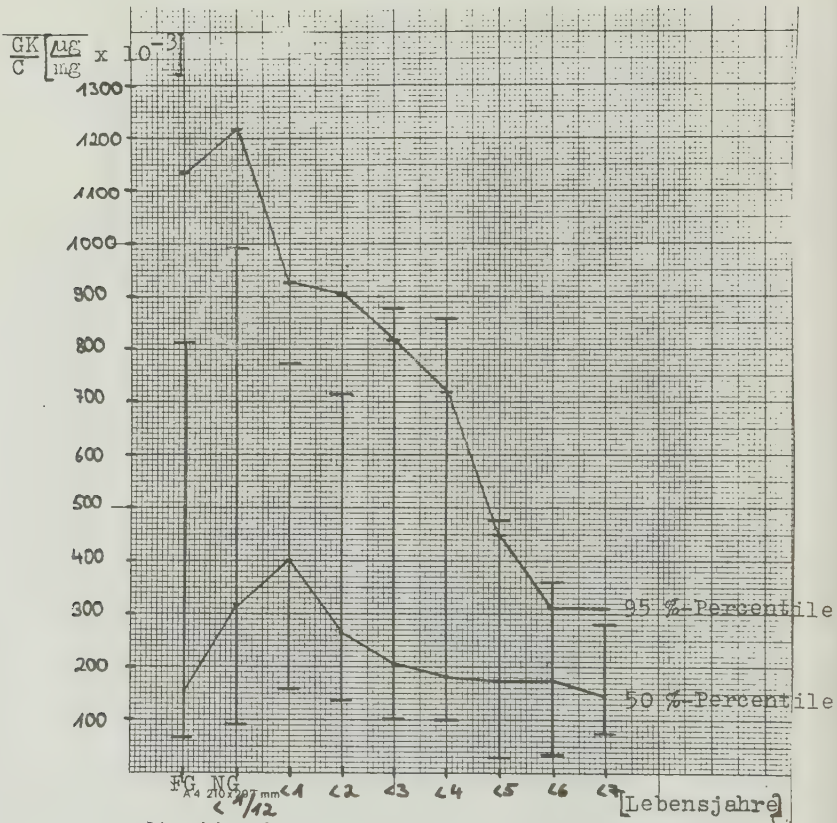


Abb.12: altersabhängige Ausscheidung von Gesamtkatecholamin pro Creatinin im 24-Std.-Urin.

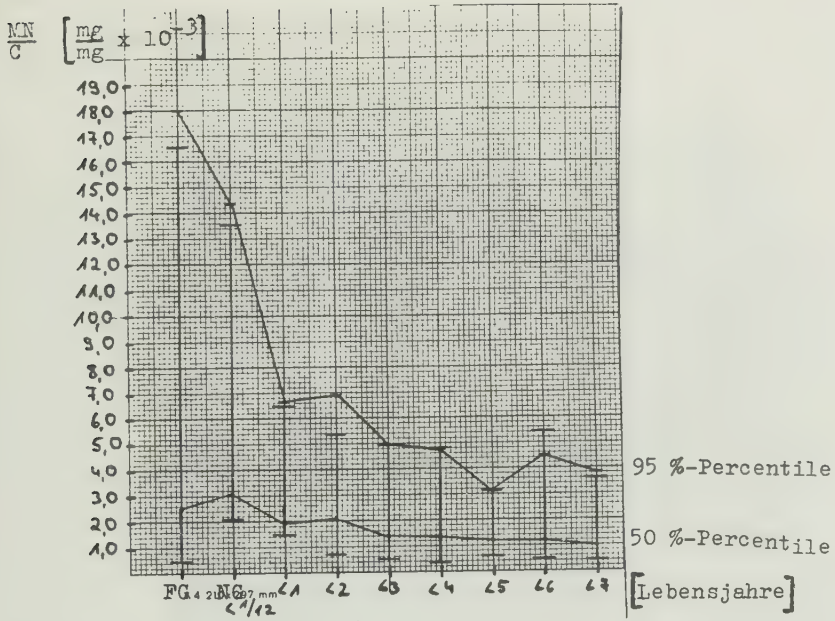


Abb.13: altersabhängige Ausscheidung von Metanephrin pro Creatinin im 24-Std.-Urin.

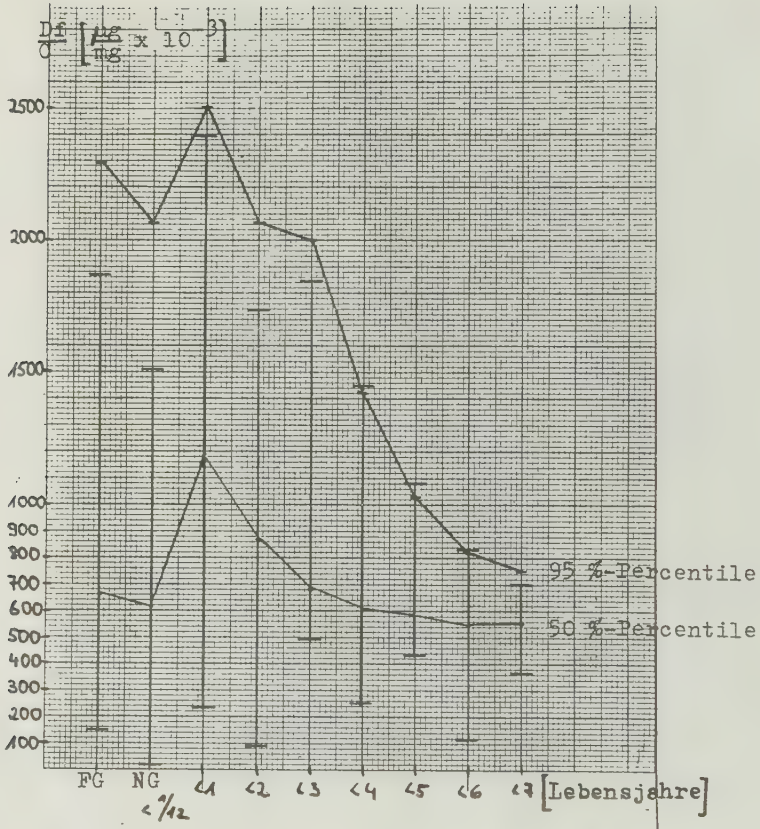


Abb.14: altersabhängige Ausscheidung von freiem Dopamin pro Creatinin im 24-Std.-Urin.

2.3. Ausscheidung im 24-Std.-Urin pro Körpergewicht:

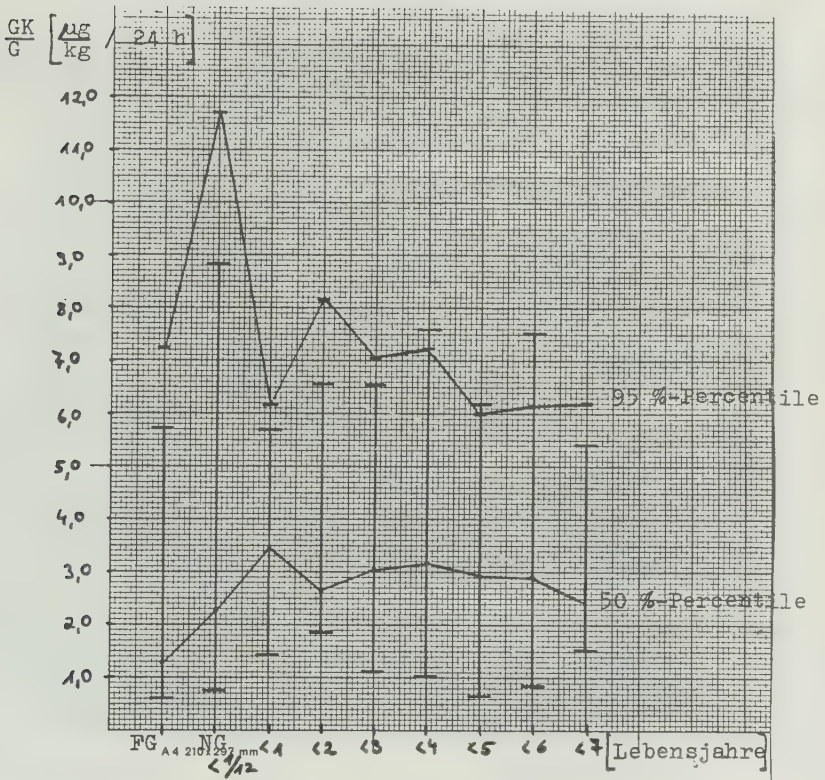


Abb.15: altersabhängige Ausscheidung von Gesamtkatecholamin im 24-Std.-Urin pro Körpergewicht.

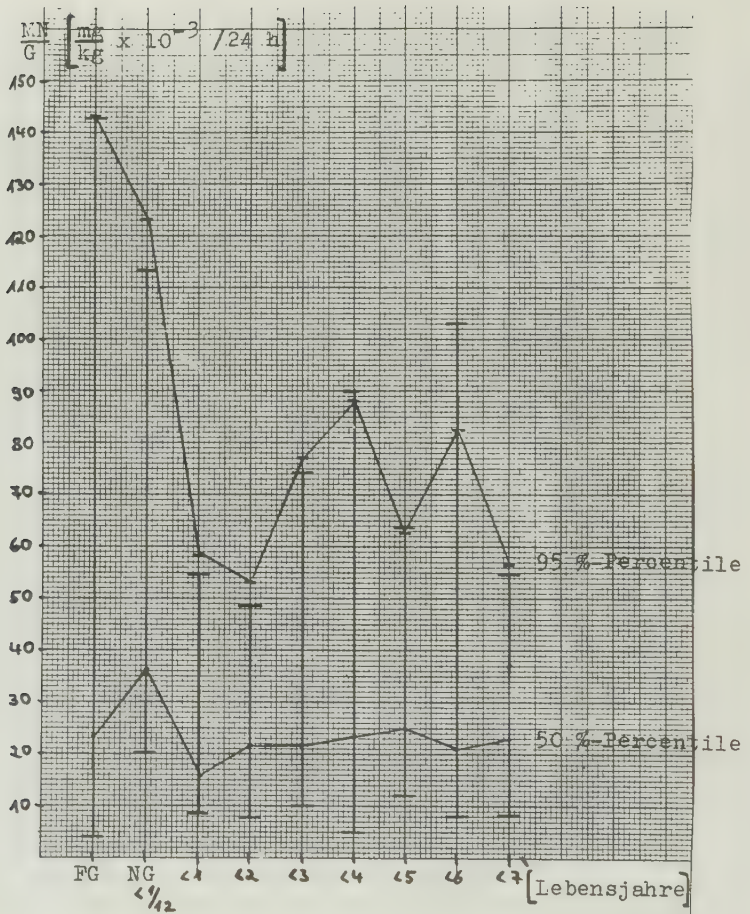


Abb.16: altersabhängige Ausscheidung von Metanephrin
im 24-Std.-Urin pro Körpergewicht.

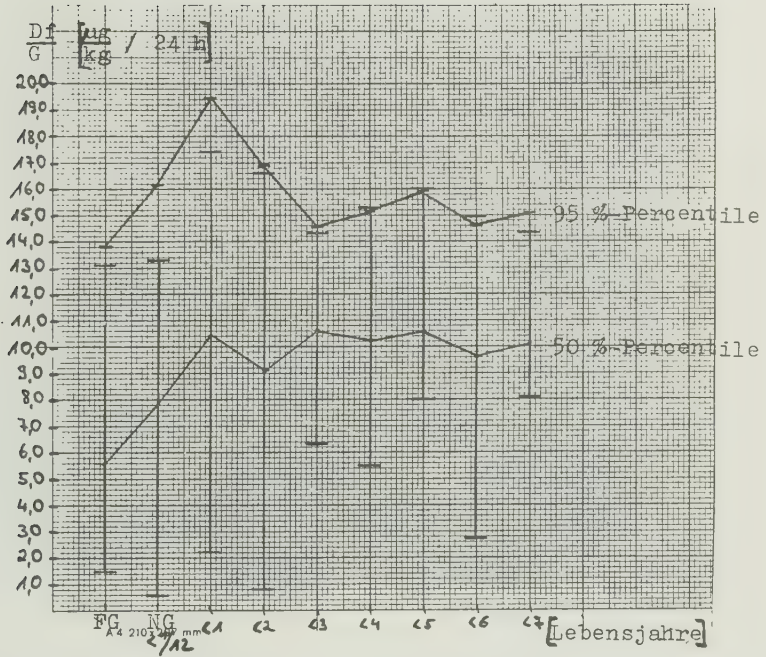


Abb.17: altersabhängige Ausscheidung von freiem Dopamin im 24-Std.-Urin pro Körpergewicht.

2.4. Ausscheidung im 24-Std.-Urin pro Körperoberfläche:

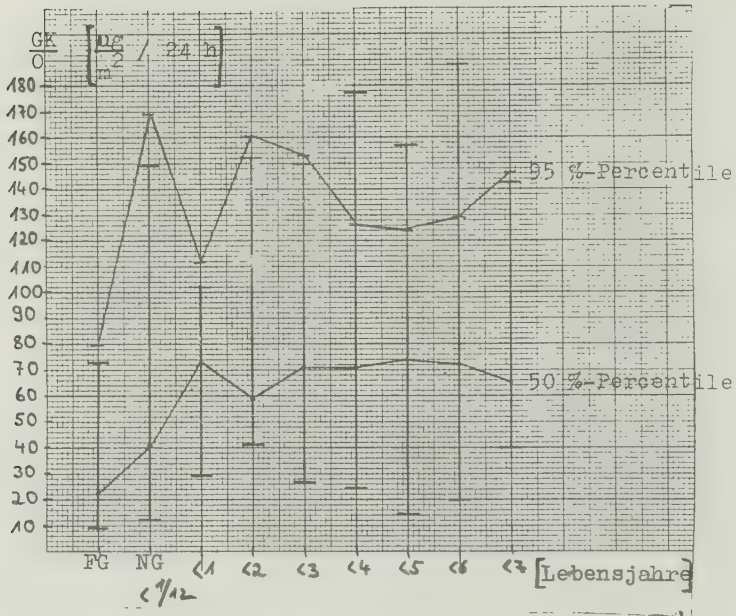


Abb.18: altersabhängige Ausscheidung von Gesamtkatecholemin im 24-Std.-Urin pro Körperoberfläche.

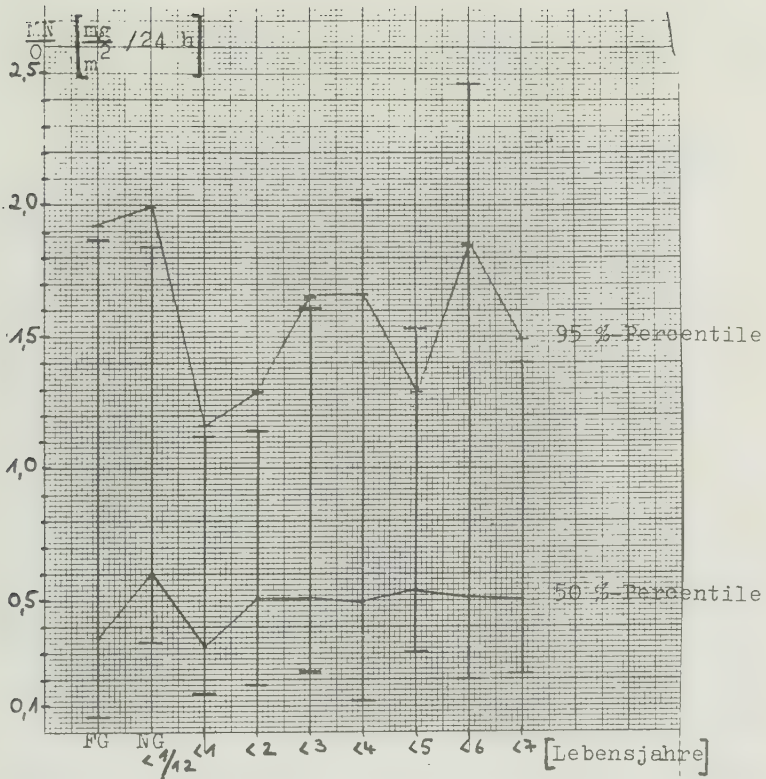


Abb.19: altersabhängige Ausscheidung von Metanephrin im 24-Std.-Urin pro Körperoberfläche.

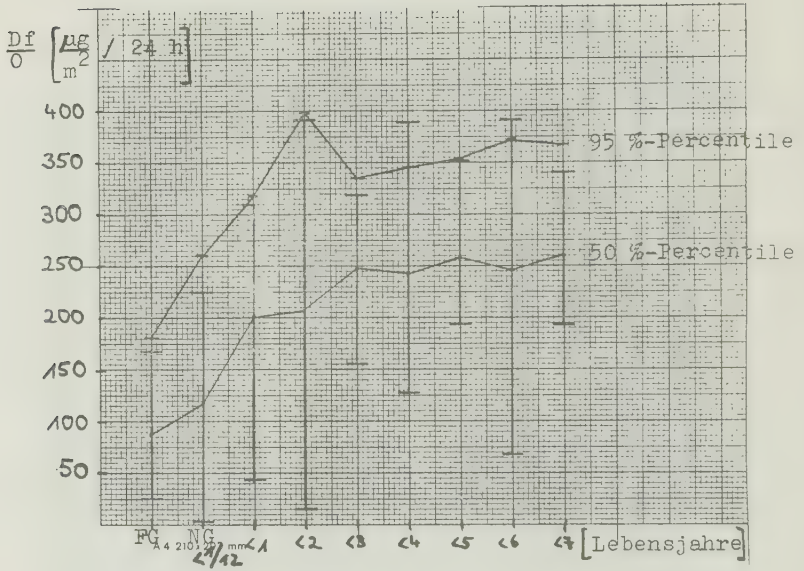


Abb.20: altersabhängige Ausscheidung von freiem Dopamin
im 24-Std.-Urin pro Körperoberfläche.

3.

Altersabhängige Richtwerte der Ausscheidung von Katecholaminen und deren Metaboliten im 24-Std.-Urin von Kleinkindern als Grundlage für die Neuroblastomdiagnostik.

Die ermittelten Richtwerte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

ÜBERLA, K.: „Toleranzgrenzen werden in der Medizin zur Angabe von Normalbereichen verwendet. Im allgemeinen wird der 95 %-Toleranzbereich ohne zusätzliche Vertrauenswahrscheinlichkeit verwendet, d.h. die Grenzen innerhalb derer 95 % der Werte der Stichprobe liegen, werden als Normbereich angesetzt“ (39).

In Anlehnung an den Normbereich wurden Richtwerte als obere Grenze des Toleranzbereichs, d.h. untere Grenze des Warnbereichs bestimmt, entsprechend den 95 %-Perzentilen der Referenzwerte.

Zur Vermeidung experimentell begründbarer Unstetigkeiten, wurden die 95 %-Perzentilen-Werte von einer Altersgruppe auch in die benachbarte übernommen, wenn die ermittelten 95 %-Perzentilen im Verlauf der Altersgruppen Unstetigkeiten aufwiesen, aber aus den zugehörigen Abb. 6 - 10 eine stetige Tendenz der Ausscheidungsmengen offensichtlich war. Abb. 6 - 10 zeigen, daß die Ausscheidung von A, NA, GK, MN und Df mit dem Lebensalter der Kleinkinder deutlich zunimmt. Somit wurde auch die vorgenommene Unterteilung der Probanden in Altersgruppen nach Tab.4 als sinnvoll für die Neuroblastomdiagnostik beibehalten.

Die Tab.8-12(Anhang) zeigen für A, NA, GK, MN und Df die Spannweite, die ermittelten 2,5 %-, 5,0 %-, 10 %-, 25 %-, 50 %-, 75 %-, 90 %-, 95 %- und 97,5 %-Perzentilen, den Median mit 95 %-Vertrauensbereich für die jeweiligen Altersgruppen. Der Vergleich der ermittelten Ausscheidungswerte mit den bekannten Werten für Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin der Arbeiten in Tabelle 3 zeigt Übereinstimmung in der Größenordnung. Aufgrund der unterschiedlichen Einteilung der Probanden in Altersgruppen ist aber ein direkter Vergleich nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit konnte

Alter	Adrenalin (A) [µg/24h]	Noradrenalin (NA) [µg/24h]	Gesamt cate- cholamin (GK) [µg/24h]	Metanephrine (MN) mg/24h	freies Dopamin (Df) [µg/24h]
7. Lebensjahr	- 47,4	- 100,0	- 161,1	- 1,53	- 333,0
6. Lebensjahr	- 46,2	- 100,0	- 120,0	- 1,53	- 330,6
5. Lebensjahr	- 33,4	- 100,0	- 115,3	- 1,29	- 258,2
4. Lebensjahr	- 29,8	- 90,3	- 111,7	- 1,29	- 250,0
3. Lebensjahr	- 20,2	- 90,3	- 92,0	- 0,92	- 197,4
2. Lebensjahr	- 18,3	- 61,2	- 67,5	- 0,50	- 197,4
Säuglinge, 29. Lebenstag bis 1 Jahr	- 11,9	- 36,1	- 37,1	- 0,47	- 127,1
Neugeborene, 1. bis 28. Lebenstag	- 7,7	- 32,3	- 34,7	- 0,47	- 55,3
Frühgeborene, 1. bis 7. Lebenstag	- 1,5	- 10,1	- 11,1	- 0,37	- 25,4

Tab.6: altersabhängige Richtwerte der Ausscheidung des gesamten Adrenalin, Noradrenalin, Metanephrens und freien Dopamins im 24-Std.-Urin bei Kleinkindern.

wegen der wesentlich höheren Probandenzahl eine engmaschigere Alterseinteilung vorgenommen werden.

Altersabhängige Ausscheidungswerte für Metanephrine bei Kleinkindern waren bisher in der Literatur nicht bekannt.

Die altersabhängige Ausscheidung von gesamtem Dopamin ist in Abbildung 11 dargestellt.

Dabei zeigt sich eine ausgeprägte Streuung der Ausscheidungsmengen von Dg, besonders im für die Neuroblastomdiagnostik bedeutsamen oberen Bereich. Über 5 % der Referenzwerte streuen zwischen dem 2- und 7-fachen Zahlenwert des Medians. (Meßfehler wurden durch Doppelbestimmung ausgeschlossen.)

Diese scheinbar physiologisch hohen Referenzwerte treten wesentlich häufiger auf, als eine zu erwartende Morbidität an Katecholamin-sezernierenden Tumoren.

Die Anwendung der 95 %-Perzentile von Dg als Richtwert zur Neuroblastomdiagnostik würde somit zu häufig falsch positiver Aussage führen. So wurde auf die Einbeziehung von gesamtem Dopamin zu den Richtwerten zur Neuroblastomdiagnostik verzichtet.

Tab.13(Anhang) zeigt die ermittelten altersabhängigen Spannweiten, Perzentilen, sowie den Median mit 95 %-Vertrauensbereich.

Ernährungsvorschrift:

Abweichend von Punkt B 2. wurde inzwischen gezeigt (11.), daß lediglich der Verzehr von Bananen eine Erhöhung der Ausscheidung von Adrenalin, Noradrenalin, Metanephrenen, Vanillin-mandelsäure und 5-Hydroxyindolessigsäure im 24-Std.-Urin über die Normgrenzen bewirken kann.

Kaffee und Ananas bewirken zwar eine geringe Zunahme der Metanephrin-Werte, ein Verzicht auf Kaffee und Ananas in normalen Mengen wird aber für nicht erforderlich gehalten (11): So besteht für Restriktionen der Nahrungsmittel bei der Sammlung von 24-Std.-Urin für die Neuroblastomdiagnostik, außer für Bananen, kein Anlaß mehr.

4. Altersabhängige Richtwerte der Ausscheidung von Gesamtkatecholaminen, Metanephrinen und freiem Dopamin pro Creatininausscheidung, pro Körpergewicht und pro Körperoberfläche im 24-Std.-Urin.

Die ermittelten Richtwerte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Ermittlung erfolgte entsprechend Punkt C 3.

Die Ausscheidung von Gesamtkatecholaminen, Metanephrinen und freiem Dopamin pro Creatininausscheidung im 24-Std.-Urin zeigt im Kleinkindesalter mit zunehmenden Lebensalter eine stetige Abnahme, entsprechend der aufgrund der anwachsenden Muskelmasse ansteigenden Creatininsynthese und -ausscheidung im Rahmen der Wachstumsphase.

Die Ausscheidung pro Körpergewicht sowie pro Körperoberfläche erfolgt mit zunehmenden Alter im untersuchten Bereich nahezu konstant.

Möglicherweise könnte die Sensitivität der Laboratoriumsdiagnostik des Neuroblastoms durch Zugrundelegung der Richtwerte von Tabelle 7 erhöht werden, da bei GK/C, MN/C, Df/C, GK/G, MN/G, Df/G, GK/O, MN/O, Df/O zusätzliche individuelle Parameter berücksichtigt sind und somit eine zusätzliche Differenzierung innerhalb der einzelnen Altersgruppe gegeben ist.

Der Nachweis der erhöhten Sensitivität ist aber noch nicht erbracht.

Ausführliche Tabellen der altersabhängigen Percentilen:
Tabellen 14 - 22 (Anhang).

Alter	$\frac{GK}{\bar{G}} \left[\frac{\mu g}{mg} \times 10^{-3} \right]$	$\frac{MN}{\bar{G}} \left[\frac{mg}{mg} \times 10^{-3} \right]$	$\frac{Df}{\bar{G}} \left[\frac{\mu g}{mg} \times 10^{-3} \right]$	$\frac{GK}{\bar{G}} \left[\frac{\mu g}{kg} / 24h \right]$	$\frac{MN}{\bar{G}} \left[\frac{mg \times 10^{-3}}{kg} / 24h \right]$	$\frac{Df}{\bar{G}} \left[\frac{\mu g}{kg} / 24h \right]$	$\frac{GK}{\bar{G}} \left[\frac{\mu g}{m^2} / 24h \right]$	$\frac{MN}{\bar{G}} \left[\frac{mg}{m^2} / 24h \right]$	$\frac{Df}{\bar{G}} \left[\frac{\mu g}{m^2} / 24h \right]$
7. Lebensjahr	- 310,9	- 3,85	- 758,8	- 6,2	- 82,7	- 15,2	- 146,1	- 1,66	- 372,1
6. Lebensjahr	- 312,9	- 4,50	- 822,4	- 6,2	- 82,7	- 15,2	- 129,4	- 1,66	- 372,1
5. Lebensjahr	- 450,0	- 4,78	- 1031,2	- 6,2	- 82,7	- 15,2	- 129,4	- 1,66	- 354,4
4. Lebensjahr	- 719,4	- 4,78	- 1425,9	- 7,2	- 82,7	- 15,2	- 129,4	- 1,66	- 345,3
3. Lebensjahr	- 819,4	- 5,00	- 2000,0	- 7,2	- 77,2	- 15,2	- 129,4	- 1,66	- 345,3
2. Lebensjahr	- 904,7	- 6,69	- 2064,7	- 8,2	- 53,1	- 16,9	- 129,4	- 1,29	- 345,3
Säuglinge, 29. Lebenstag bis 1 Jahr	- 928,2	- 6,69	- 2505,9	- 6,2	- 58,6	- 19,4	- 129,4	- 1,16	- 317,9
Neugeborene, 1. bis 28. Lebenstag	- 1217,7	- 14,38	- 2064,7	- 11,7	- 123,1	- 16,2	- 129,4	- 1,99	- 261,5
Frühgeborene, 1. bis 7. Lebenstag	- 1135,3	- 18,00	- 2294,1	- 7,2	- 54,7	- 13,8	- 79,7	- 0,62	- 180,4

Tab.7: altersabhängige Richtwerte von $\frac{GK}{\bar{G}}, \frac{MN}{\bar{G}}, \frac{Df}{\bar{G}}, \frac{GK}{\bar{G}}, \frac{MN}{\bar{G}}, \frac{Df}{\bar{G}}$, bei Kindern.

5. Empfehlung für die Neuroblastomdiagnostik anhand der Bestimmung von Katecholaminen und deren Metaboliten im 24-Std.-Urin von Kleinkindern.

Nach dem gegenwärtigen Wissensstand wird empfohlen zur Neuroblastomdiagnostik und -verlaufskontrolle die Ausscheidungsmengen im 24-Std.-Urin von Adrenalin, Noradrenalin, Metanephrinen und freiem Dopamin entsprechend Punkt B 3.3. zu bestimmen und als Grundlage zur Beurteilung die Richtwerte der Tabelle 6 als untere Grenze des Warnbereichs heranzuziehen.

Eine sensitivere Beurteilung einer ermittelten Ausscheidungsmergje ermöglichen zusätzlich die ausführlichen Percentilentabellen: Tab. 8-12 (Anhang).

Vergleich der Messungen von Df und Dg mittels Spektralfluorometer und mittels HPLC anhand einer Stichprobe (n=22), durch Prüfung der Korrelation und t-Test für paarweise angeordnete Meßwerte (27).

Je 22 Eluate von Df und Dg wurden sowohl gemäß Punkt B 3.3.2.3., als auch gemäß Punkt B 3.3.2.4. gemessen. Die Meßergebnisse sind für Df in Abb. 21 und für Dg in Abb. 22 dargestellt.

Die Berechnung der linearen Korrelation ergab:

- für Df: $r = 0,9837$ (n=22)

Die Messungen von Df mittels Spektralfluorometer und HPLC sind auf dem 0,1 % - Niveau hochsignifikant korreliert.

- für Dg: $r = 0,9647$ (n=22)

Die Messungen von Dg mittels Spektralfluorometer und HPLC sind auf dem 0,1 % - Niveau hochsignifikant korreliert.

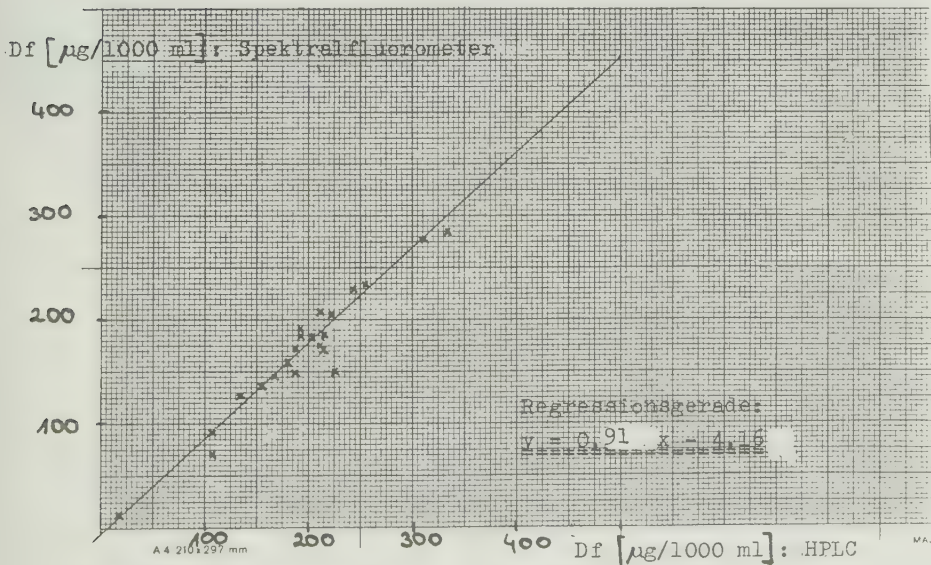


Abb.21: Vergleichende Messung von Df mittels Spektralfluorometer und HPLC.

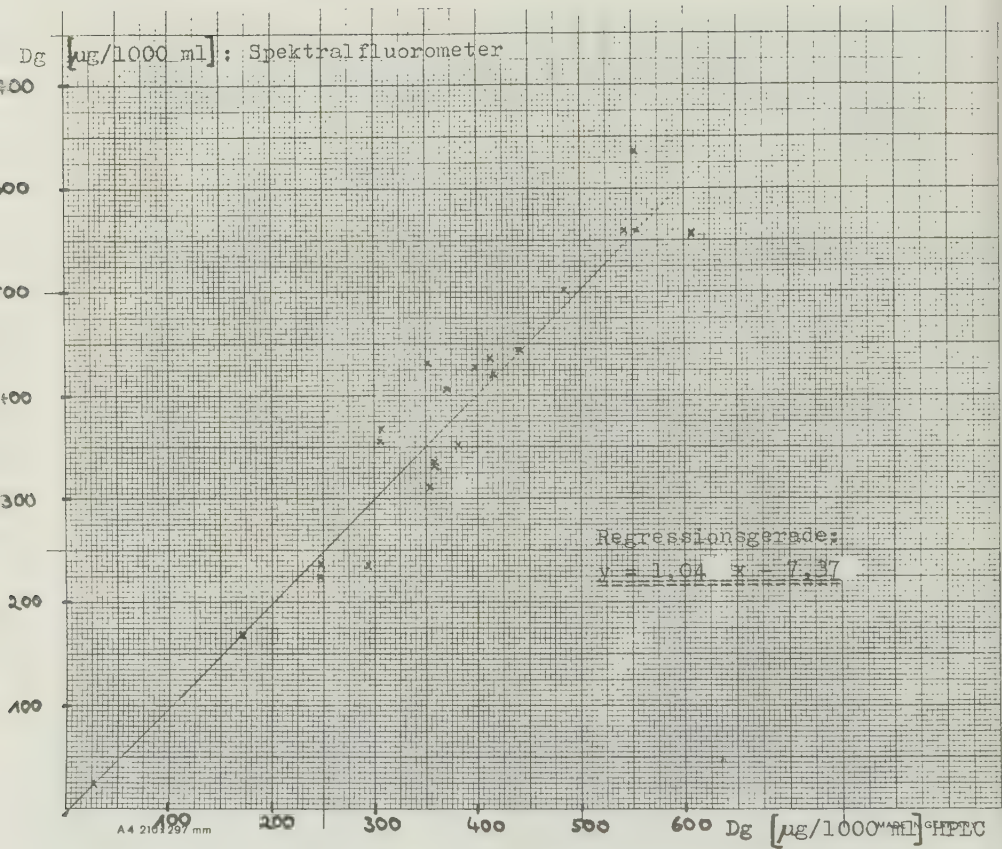


Abb.22: Vergleichende Messung von Dg mittels Spektralfluorometer und HPLC.

Die Testung mittels t-Test für paarweise angeordnete Meßwerte ergab:

- für Df: $\mu_d = - 22,40$
=====

95 % - VB für μ_d : $- 28,13 \leq \mu_d \leq - 16,69$
=====

d.h.: es besteht ein statistischer Meßunterschied zwischen den Messungen von Df mittels Spektralfluorometer und HPLC.

- für Dg: $\mu_d = 12,76$
=====

95 % - VB für μ_d : $- 3,70 \leq \mu_d \leq 29,22$
=====

d.h.: es war kein statistischer Meßunterschied zwischen den Messungen von Dg mittels Spektralfluorometer und HPLC nachweisbar.

D Z U S A K L E N F A S S U N G

Neuroblastome sind embryonale maligne neurogene Tumoren des chromaffinen Systems welche vor allem im Kleinkindesalter auftreten. Deren erhöhte Sekretion von Katecholaminen, die mit ihren Metaboliten im Urin ausgeschieden werden, ist der Laboratoriumsdiagnostik zugänglich.

Bisher war über die altersabhängige quantitative Ausscheidung der Katecholamine und deren Metaboliten im Urin von Kleinkindern wenig in der Literatur bekannt.

Unter Verwendung des G catecholamin-Säulentests der Fa. BIO-RAD München, wurden im 24-Std.-Urin von 131 Kindern im Alter vom Frühgeborenen bis zum 7. Lebensjahr die Ausscheidungsmengen von gesamtem Adrenalin und gesamtem Noradrenalin mittels Spektralfluorometrie, von gesamten Metanephrinen mittels Spektralphotometrie, von freiem und gesamtem Dopamin mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie gemessen. Aus diesen Meßwerten wurden altersabhängige Percentilen und Richtwerte zur Neuroblastomdiagnostik und Verlaufskontrolle graphisch ermittelt. Zusätzlich wurden die Ausscheidungsmengen von Gesamtkatecholamin (ges. Adrenalin + ges. Noradrenalin), gesamten Metanephrinen und freiem Dopamin pro ausgeschiedene Menge Creatinin, pro Körpergewicht und pro Körperoberfläche berechnet und altersabhängige Percentilen und Richtwerte ermittelt.

Weiterhin wurden die Meßverfahren für freies und gesamtes Dopamin einerseits mit Spektralfluorometrie, andererseits mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie anhand einer Stichprobe durch Prüfung der Korrelation und t-Test für paarweise angeordnete Meßwerte miteinander verglichen.

Ergebnisse:

1. Altersabhängige Richtwerte der Ausscheidungs menge des gesamten Adrenalins, Noradrenalins, Gesamtkatecholamins, Metanephrins und freien Dopamins im 24-Std.-Urin bei Kleinkindern (nachfolgend Tab.6).

2. Altersabhängige Richtwerte der Ausscheidungs-
menge von Gesamtkatecholamin, gesamten Metanephrinen und freiem
Dopamin pro Creatininausscheidung, pro Körpergewicht
und pro Körperoberfläche im 24-Std.-Urin bei Kleinkin-
dern (nachfolgend Tab.7).
3. Die Katecholaminausscheidung und Metanephrinausscheidung
im 24-Std.-Urin nimmt im Kleinkindesalter mit dem Lebens-
alter zu.
4. Da bei über 5 % der Probanden die Ausscheidungs-
menge von Dopamin im 24-Std.-Urin um bis zum Siebenfachen
des Medians erhöht lagen, wurde auf die Einbeziehung des
gesamten Dopamins zu den Richtwerten verzichtet. Die
Ursache der erhöhten Werte ist nicht bekannt.
5. Die Ausscheidung von Gesamtkatecholamin, gesamten Meta-
nephrinen und freiem Dopamin pro Creatininausscheidung
im 24-Std.-Urin nimmt im Kleinkindesalter mit zunehmendem
Lebensalter aufgrund der infolge anwachsenden Muskelmasse
ansteigenden Creatininsynthese und -ausscheidung ab.
Die Ausscheidung pro Körpergewicht, sowie pro Körperober-
fläche erfolgt mit zunehmendem Alter im untersuchten Bereich
nahezu konstant.
6. Beide Meßverfahren sind sowohl für freies als auch für
gesamtes Dopamin hochsignifikant korreliert, bei der
Messung von freiem Dopamin mittels Hochdruckflüssigkeits-
chromatographie wurden statistisch signifikant gering
höhere Werte gemessen als mit Spektralfluorometrie. Für
die Messungen von Dopamin wurde kein statistisch
signifikanter Meßunterschied nachgewiesen.

Alter	Adrenalin (A) [µg/24h]	Noradrenalin (NA) [µg/24h]	GesamtKate- cholamin (GK) [µg/24h]	Metanephrine (MN) mg/24h	freies Dopamin (Df) [µg/24h]
7. Lebensjahr	- 47,4	- 100,0	- 161,1	- 1,53	- 333,0
6. Lebensjahr	- 46,2	- 100,0	- 120,0	- 1,53	- 330,6
5. Lebensjahr	- 33,4	- 100,0	- 115,3	- 1,29	- 258,2
4. Lebensjahr	- 29,8	- 90,3	- 111,7	- 1,29	- 250,0
3. Lebensjahr	- 20,2	- 90,3	- 92,0	- 0,92	- 197,4
2. Lebensjahr	- 18,3	- 61,2	- 67,5	- 0,50	- 197,4
Säuglinge, 29. Lebenstag bis 1 Jahr	- 11,9	- 36,1	- 37,1	- 0,47	- 127,1
Neugeborene, 1. bis 28. Lebenstag	- 7,7	- 32,3	- 34,7	- 0,47	- 55,3
Frühgeborene, 1. bis 7. Lebenstag	- 1,5	- 10,1	- 11,1	- 0,37	- 25,4

Tab.6: altersabhängige Richtwerte der Ausscheidung des gesamten Adrenalins, Noradrenalins, Metanephrens und freien Dopamins im 24-Std.-Urin bei Kleinkindern.

Alter	$\frac{GK}{G} \left[\frac{Mg}{mg} \times 10^{-3} \right]$	$\frac{MN}{G} \left[\frac{mg}{mg} \times 10^{-3} \right]$	$\frac{Df}{G} \left[\frac{Mg}{mg} \times 10^{-3} \right]$	$\frac{GK}{G} \left[\frac{Mg \times 10^{-3}}{kg} / 24h \right]$	$\frac{MN}{G} \left[\frac{mg \times 10^{-3}}{kg} / 24h \right]$	$\frac{Df}{G} \left[\frac{Mg}{kg} / 24h \right]$	$\frac{GK}{G} \left[\frac{Mg}{mg} / 24h \right]$	$\frac{MN}{G} \left[\frac{mg}{mg} / 24h \right]$	$\frac{Df}{G} \left[\frac{Mg}{mg} / 24h \right]$
7. Lebensjahr	- 310,9	- 3,85	- 758,8	- 6,2	- 82,7	- 15,2	- 146,1	- 1,66	- 372,1
6. Lebensjahr	- 312,9	- 4,50	- 822,4	- 6,2	- 82,7	- 15,2	- 129,4	- 1,66	- 372,1
5. Lebensjahr	- 450,0	- 4,78	- 1031,2	- 6,2	- 82,7	- 15,2	- 129,4	- 1,66	- 354,4
4. Lebensjahr	- 719,4	- 4,78	- 1425,9	- 7,2	- 82,7	- 15,2	- 129,4	- 1,66	- 345,3
3. Lebensjahr	- 819,4	- 5,00	- 2000,0	- 7,2	- 77,2	- 15,2	- 129,4	- 1,66	- 345,3
2. Lebensjahr	- 904,7	- 6,69	- 2064,7	- 8,2	- 53,1	- 16,9	- 129,4	- 1,29	- 345,3
Säuglinge, 29. Lebenstag bis 1 Jahr	- 928,2	- 6,69	- 2505,9	- 6,2	- 58,6	- 19,4	- 129,4	- 1,16	- 317,9
Neugeborene, 1. bis 28. Lebenstag	- 1217,7	- 14,38	- 2064,7	- 11,7	- 123,1	- 16,2	- 129,4	- 1,99	- 261,5
Frühgeborene, 1. bis 7. Lebenstag	- 1135,3	- 18,00	- 2294,1	- 7,2	- 54,7	- 13,8	- 79,7	- 0,62	- 180,4

Tab.7: altersabhängige Richtwerte von $\frac{GK}{G}$, $\frac{MN}{G}$, $\frac{Df}{G}$, $\frac{GK}{G}$, $\frac{MN}{G}$, $\frac{Df}{G}$, $\frac{GK}{G}$, $\frac{MN}{G}$, $\frac{Df}{G}$, bei Kindern.

E L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 ARIEL, I.M. and PACK, G.T.: Cancer and allied diseases of infancy and childhood. Little, Brown, Boston (1960).
- 2 BACHMANN, K.D.: Das Neuroblastoma sympathicum. Z. Kinderheilkunde 86:710 (1962).
- 3 BELL, M.: In Recent Results in Cancer Research, Neuroblastomas. Biochem. Studies, Bohuon, C. Hrsg. 42-51, Springer Berlin-Heidelberg-New York (1966).
- 4 BETKE, K., LAMPERT, F., RIEGEL, K.: Elementare Pädiatrie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 164 ff., (1978).
- 5 BIO-RAD LABORATORIES GMBH, München: Arbeitsanleitung Catecholamine, Säulentest zur quantitativen Bestimmung biogener Amine im Harn.
- 6 Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, Geigy Pharmazeutika, 7. Aufl. S. 720 ff., (1977).
- 7 von EULER, U.S.: Identification of the sympathicomimetic ergone in adrenergic nerves of cattle (sympathic N) with laevo-noradrenalin. Acta physiol. scand. 16, 63 (1948).
- 8 GITLOW, St.E., BERTANI, L.M., RAUSEN, A., GRIBETZ, D. u. DZIEDZIC, St.: Cancer (Philadelphia) 25, 1377-1388.
- 9 GREEFF, K. u. STROBACH, H.: Diagnose des Phäochromozytoms und Neuroblastoms durch Bestimmung von Noradrenalin, Adrenalin und deren Metaboliten im Harn. Herz/Kreislauf, 2. Jg. Nr. 11 (1970).
- 10 GROSS, R.E., FARBER, S. and MARTIN, L.W.: Neuroblastoma sympathicum. A Study and report of 217 cases. Pediatrics 23, 1179 (1959).
- 11 HEINEMANN, G., SCHIEVELBEIN, H., EBERHAGEN, D. und RAHLFS, V.: Der Einfluß von Nahrungsmitteln und Rauchen auf die klinisch-chemische Diagnostik von Phäochromozytom, Neuroblastom und Karzinoid-Syndrom. Klin. Wochenschr. 59: 1165-1173 (1981).
- 12 HOLTZ, P., PALM, D.: Brenzkatechinamine und andere sympathicomimetische Amine. Ergebn. Physiol. 58, 1, (1966).
- 13 ISAACS, H., MEDALIE, M. and POLITZER, W.M.: Noradrenaline-secreting neuroblastoma. Brit. med. J. i: 401 (1959).

- 14 JEQUIER,E.: Mesure biochimique de la fonction de la médullosurrénale et du système sympathique en clinique. Schweiz. med. Wschr. 100, 532 (1970).
- 15 KÄSER,H.: Maligne neurogene Sympathikustumoren und Katecholaminstoffwechsel. Pädiatr. Fortbildungskurse f. d. Praxis, Vol. 39, Karger Basel (1974).
- 16 KÄSER,H.: Die Ausscheidung von Catecholaminmetaboliten im Urin bei Sympathicustumoren. Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. 17: 322 (1961).
- 17 KÄSER,H.: Pharmacol. Rev. 18, 659-665, (1966).
- 18 KÄSER,H., SCHWEISGUTH,O., SELLEI,K. u. SPENGLER,G.A.: Helv. Med. Acta 30, 628-639, (1963).
- 19 KÄSER,H., WAGNER,H.P. und KÜFFER,F.: Maligne, sekretorisch anscheinend inaktive Sympathikustumoren im Kindesalter. Helv. paediat. Acta 24: 128-134, (1969).
- 20 MARSDEN,H.B. and STEWARD,J.K.: Tumours in childhood. Springer Berlin (1968).
- 21 MASON,G.A.,HART-MERCER,J.,MILLAR,E.J.,STRANG,L.B. and WYNNE,N.A.: Adrenaline-secreting neuroblastoma in an infant. Lancet ii:322, (1957).
- 22 MICHAEL,P.: Tumours of infancy and childhood. Lippincott Philadelphia (1964).
- 23 MOYER,T.P.,NAI-SIANG JIANG, TYCE,G.M. and SHEPS,S.G.: Analysis for Urinary Catecholamines by Liquid Chromatography with Amperometric Detection: Methodology and Clinical Interpretation of Results, Clinical Chemistry, Vol. 25, No. 2, (1979).
- 24 PETRÁŠEK,J., DUBORSKY,J. und CHARVÁT,J.: Endokrinologie 50, 308-316, (1966).
- 25 RICKHAM,P.P., SOPER,R.T. und STAUFER,U.G.: Kinderchirurgie, S. 232, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1975).
- 26 RITZEL u. HUNZINGER: Klin. Wschr. 41, 419, (1963).
- 27 SACHS,L.: Statistische Methoden, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 4. Aufl. S.56 ff., (1979).
- 28 SANDLER,M.: Biosynthesis and metabolism of catecholamines. Schweiz. med. Wschr. 100, 526, (1970).

- 29 SCHIEVELBEIN, H.: Bayr. Ärzteblatt 31, S. 14-20, (1976).
- 30 SCHÜMMANN, H.J., KRONEBERG, G.: New Aspects of Storage and Release Mechanisms of Catecholamines. Springer Berlin, S.1, (1970).
- 31 SIEGENTHALER, W.: Klin. Pathophysiologie, 4. Aufl., S.386, Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1979).
- 32 SIMON, C.: Klinische Pädiatrie, XVI. 626 ff., 4. Aufl., Schattauer Stuttgart-New York, (1980).
- 33 STUDNITZ, W.v.: Klin. Wochenschrift 40, 163-167, (1962).
- 34 STUDNITZ, W.v., KÄSER, H. u. SJOERDSMA, A.: N.Eng.J.Med. 296, 232-235, (1963).
- 35 SYMINGTON, T.: Functional pathology of the human adrenal gland. Livingstone, Edinburgh, (1969).
- 36 1. Symposium on catecholamines. Pharmacol.Rev.11,233,(1959).
- 37 2. Symposium on catecholamines. Pharmacol.Rev.18,29,(1966).
- 38 UDENFRIEND, S.: Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Academic Press, New York, (1964).
- 39 ÜBERLA, K.: Biomathematik, ISB Inst. für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik der Universität München, S.86, (1976).
- 40 VOORHESS, M.L.: Pediatrics 39, 252, (1967).
- 41 VOORHESS, M.L., GARDNER, L.J.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 21, 321-335, (1961).
- 42 WERNER, U.: Verbesserte TriHydroxyindolmethode zur Bestimmung der Harnkatecholamine, Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13. Jg., Heft 8, S.341-349, (1975).
- 43 WISSER, H.: Bestimmung der freien Katecholamine im Harn. Z. Klin. Chemie u. Klin. Biochemie, 8. Jg., Heft 6, S. 637-648, (1970).
- 44 WISSER, H. und KNOLL, E.: Die Analytik der Katecholamine und einiger Abbauprodukte im Urin und Plasma. Z. Klin. Chemie und Klin. Biochemie, 11.Jg., Heft 1, S.3, (1973).

D ANHANG

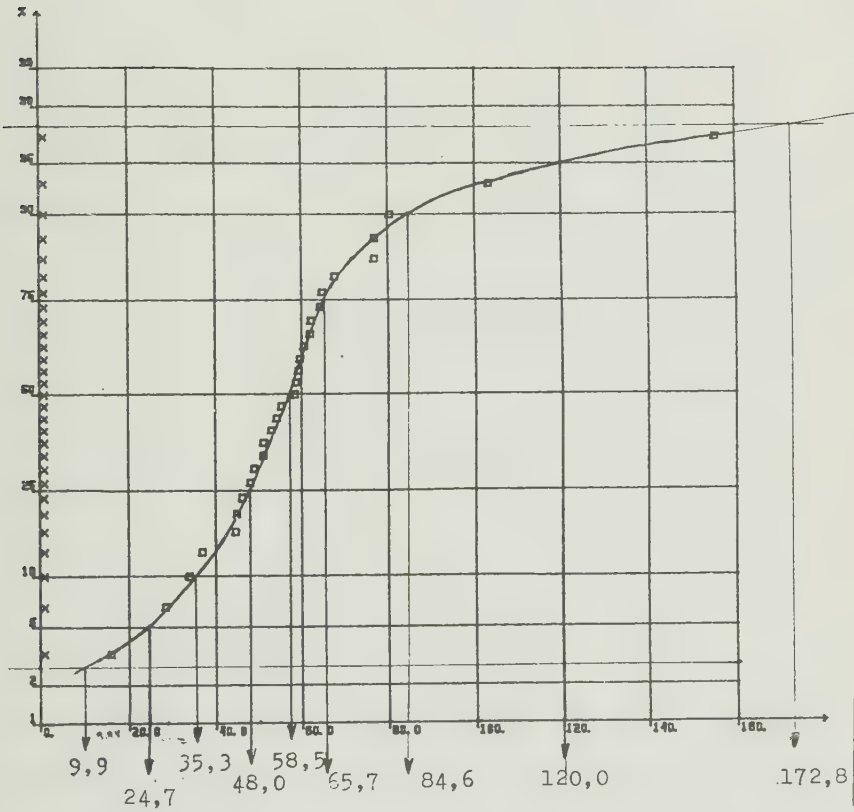


Abb.23: Beispiel für die Bestimmung der Perzentilen:
Gesamtkatecholaminausscheidung im 6. Lebensjahr.

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	P E R C E N T I L E N										Minimum der Referenzwerte		M E D I A N und 95 % - Vertrauensbereich										Maximum der Referenzwerte	
		2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %															
7	12	3,9	4,2	4,8	8,4	15,8	23,4	36,2	47,4	85,7					5,95	15,82	24,90								
6	29	2,6	3,9	5,9	9,4	14,9	24,3	35,0	46,2	62,7					11,88	14,93	23,78								
5	21	3,0	3,8	5,0	8,4	14,6	19,2	28,6	33,4	36,2					9,69	14,58	18,10								
4	21	2,7	3,7	5,0	8,7	11,9	15,0	24,7	29,8	33,3					9,21	11,85	13,64								
3	14	2,3	2,5	3,0	5,4	9,9	15,1	18,6	20,2	21,1					5,51	9,85	15,39								
2	7	0,0	0,0	3,6	8,1	8,8	12,1	17,0	18,3	19,2					5,70	8,84	16,32								
1/12 -12/12	10	0,1	0,4	0,8	1,5	2,3	7,2	10,8	11,9	12,7					1,42	2,27	9,38								
1/12 NG.	7	0,0	0,0	0,0	0,4	1,5	4,7	6,6	7,7	8,5					0,00	1,47	5,49								
7 Tg. FG.	10	0,0	0,0	0,0	0,8	0,9	1,1	1,4	1,5	1,6					0,36	0,93	1,21								

Tab.8: Adrenalin Ausscheidung A im 24-Std.-Urin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$] ;

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	PERCENTILIEN										MEDIAN und 95 % - Vertrauensbereich	
		Referenzwerte	2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %	Maximum der Referenzwerte	$\bar{x}$
7	12	15,1	8,4	12,3	16,9	27,4	43,8	54,7	69,1	92,1	107,9	78,5	29,85
6	29	3,3	17,8	19,7	21,5	28,4	38,6	48,2	60,0	80,0	150,0	131,8	32,62
5	21	6,8	3,8	7,4	12,1	22,1	35,2	48,4	62,9	100,0	136,2	107,2	23,67
4	21	8,2	5,1	8,2	12,0	19,3	31,3	45,1	59,3	68,9	136,5	108,1	19,54
3	14	12,6	2,0	6,5	12,2	21,2	29,6	42,1	62,2	90,3	112,1	79,5	19,14
2	7	11,9	8,7	11,5	11,5	14,1	20,0	43,3	56,5	61,2	64,2	54,1	11,90
1/12 -12/12	10	8,6	7,9	8,1	8,4	11,5	15,5	24,0	31,6	36,1	40,2	32,1	9,55
< 1/12 NG.	7	1,6	0,0	0,9	1,3	2,9	7,8	16,1	27,7	32,3	35,2	26,0	1,57
< 7 Jg. FG.	10	0,8	0,6	0,7	0,8	1,0	2,4	5,4	9,2	10,1	10,6	9,4	1,02
													2,35
													7,97

Tab.9: Noradrenalinausscheidung NA im 24-Std.-Urin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$] ;

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	Minimum der Referenzwerte	P E R C E N T I L E N										Maximum der Referenzwerte	M E D I A N und 95 % - Vertrauensbereich		
			2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %	$\bar{x}$				
7	12	38,9	36,6	36,7	37,7	42,9	55,7	75,3	117,8	161,1	204,2	127,7	41,74	55,68	74,87	
6	29	15,9	9,9	24,7	35,3	48,0	58,5	65,7	84,6	120,0	172,8	155,6	49,00	58,49	62,18	
5	21	10,4	3,5	10,6	19,8	34,6	56,1	69,4	84,5	115,3	153,7	123,8	32,85	56,06	68,87	
4	21	14,5	13,1	15,3	19,8	29,5	48,5	58,9	73,1	111,7	158,9	121,8	30,21	48,48	56,96	
3	14	15,8	3,7	11,9	21,7	33,2	40,7	51,7	73,7	92,0	105,3	85,0	30,13	40,69	61,07	
2	7	20,1	16,9	17,2	18,2	21,5	32,1	55,8	64,1	67,5	68,7	63,0	20,06	32,06	62,95	
$\frac{1}{12}$ - $\frac{12}{12}$	10	10,5	9,5	10,0	10,4	12,1	18,5	31,6	36,4	37,1	37,8	36,6	10,98	18,53	34,46	
$\leq \frac{1}{12}$ NG.	7	2,6	0,0	0,6	2,3	5,4	9,2	22,5	31,8	34,7	36,4	30,5	2,64	9,21	30,53	
≤ 7 Tg. FG.	10	1,5	0,0	1,1	1,5	2,0	3,4	7,6	10,1	11,1	11,9	10,3	1,86	3,41	8,86	

Tab. 10: Gesamt-Katecholaminausscheidung GK im 24-Std.-Urin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$]

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	P E R C E N T I L E N										M E D I A N und 95 % - Vertrauensbereich		
		Referenzwerte	2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %	Maximum der Referenzwerte		$\bar{x}$
7	12	0,20	0,16	0,17	0,19	0,26	0,46	0,87	1,19	1,31	1,37	1,24	0,25	0,46 0,90
6	29	0,16	0,15	0,17	0,18	0,27	0,42	0,66	1,09	1,53	1,99	1,86	0,29	0,42 0,58
5	21	0,22	0,20	0,22	0,24	0,29	0,38	0,57	0,87	1,12	1,37	1,15	0,30	0,38 0,57
4	21	0,08	0,06	0,07	0,10	0,20	0,32	0,54	0,89	1,29	1,67	1,35	0,24	0,32 0,54
3	14	0,16	0,14	0,15	0,16	0,19	0,28	0,49	0,81	0,92	1,00	0,89	0,17	0,28 0,59
2	7	0,10	0,00	0,00	0,04	0,14	0,24	0,35	0,44	0,50	0,54	0,47	0,10	0,24 0,47
$\frac{1}{12}$ - $\frac{12}{12}$	10	0,03	0,02	0,03	0,03	0,05	0,13	0,27	0,39	0,46	0,52	0,40	0,05	0,13 0,31
< $\frac{1}{12}$ NG.	7	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,13	0,31	0,44	0,47	0,48	0,42	0,06	0,13 0,42
< 7 Tg. FG.	10	0,01	0,02	0,02	0,02	0,03	0,05	0,08	0,23	0,37	0,46	0,26	0,01	0,05 0,26

Tab.11: Metanephrinausscheidung MN im 24-Std.-Urin [mg/24 h];

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	Minimum der Referenzwerte	P E R C E N T I L E N										Maximum der Referenzwerte			M E D I A N und 95 % - Vertrauensbereich		
			2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %				$\bar{x}$			
7	12	154,1	64,1	112,3	172,9	205,3	217,4	262,8	304,8	333,0	350,0	306,6	203,12	217,37	257,99			
6	29	55,2	29,7	98,8	129,1	159,1	192,3	229,1	259,7	330,6	347,4	343,8	166,38	192,32	219,75			
5	21	143,9	138,2	144,7	150,0	170,9	192,9	202,7	216,5	258,2	294,4	264,6	174,31	192,87	203,23			
4	21	82,2	71,5	84,1	100,0	126,9	149,1	183,5	209,7	250,0	315,9	275,3	130,95	149,12	169,67			
3	14	93,9	89,8	92,6	95,6	102,4	148,5	175,3	189,3	196,6	201,4	193,9	100,23	148,49	179,23			
2	7	7,1	0,2	2,1	5,5	17,2	117,2	184,6	194,4	197,4	198,8	194,6	7,10	117,20	194,60			
^{1/12} -12/12	10	12,5	0,0	1,3	15,3	34,2	68,1	78,4	105,9	127,1	146,9	107,7	28,87	68,12	92,43			
< ^{1/12} NG.	7	1,1	0,0	0,0	0,0	10,0	23,9	36,5	48,3	55,3	60,8	46,2	1,10	23,91	46,19			
< 7 Tg. EG.	10	5,8	4,7	5,0	5,2	5,7	16,7	20,3	22,6	25,4	27,1	23,7	5,80	16,72	21,15			

Tab.1.2 : Ausscheidung von freiem Dopamin Df im 24-Std.-Urin [$\mu\text{g}/24\text{h}$];

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	PERCENTILLEN											Maximum der Referenzwerte	MEDIAN und 95 % - Vertrauensbereich	
		Minimum der Referenzwerte	2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %	Maximum der Referenzwerte			$\bar{x}$
7	12	272,3	200,0	242,9	294,7	345,3	400,4	500,0	581,2	630,6	694,1	597,8	344,1	400,4	505,7
6	29	139,2	95,3	211,8	281,2	329,4	398,3	490,6	621,2	743,5	1740,0	1446,9	331,1	398,3	472,9
5	21	262,6	254,1	263,5	278,8	323,5	392,3	457,7	635,3	1072,9	1165,1	1083,4	328,3	392,3	448,9
4	21	126,9	75,3	138,8	169,4	211,8	296,3	450,6	669,4	785,9	2000,0	1992,9	227,9	296,3	361,2
3	14	107,7	60,0	95,3	136,5	200,0	293,1	350,6	1187,1	1351,8	1438,8	1293,5	189,5	293,1	357,7
2	7	193,9	118,2	141,2	182,4	241,4	302,5	557,7	769,4	831,2	861,2	737,5	193,9	302,5	737,5
1/12 -12/12	10	40,0	35,2	337,4	38,8	50,0	99,5	135,3	250,0	339,7	422,1	264,8	41,1	99,5	160,0
< 1/12 NG.	7	23,9	7,1	13,2	20,7	34,0	46,0	62,3	97,5	115,8	129,4	90,1	23,9	46,0	90,1
< 7 TG. FG.	10	8,6	7,8	8,2	8,6	15,0	26,2	29,1	36,5	56,8	72,1	41,2	8,6	26,2	29,5

Tab.1.3: Ausscheidung von gesamtem Dopamin Dg im 24-Std.-Urin [$\mu\text{g}/24 \text{ h}$] ;

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	Minimum der Referenzwerte	P E R C E N T I L E N										Maximum der Referenzwerte	M E D I A N und 95 % - Vertrauensbereich		
			2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %				$\bar{x}$	
7	12	75,6	70,6	72,7	78,8	97,7	146,5	194,1	262,7	310,9	349,7	282,2	98,7	146,5	191,8	
6	29	35,2	20,0	70,9	97,1	128,8	175,9	200,0	248,8	312,9	371,2	360,7	137,7	175,9	188,1	
5	21	28,9	8,8	33,2	71,8	111,5	174,4	217,7	267,9	450,0	591,2	477,2	119,5	174,4	191,6	
4	21	102,9	84,1	98,8	117,7	147,7	182,3	238,8	310,6	719,4	1055,9	858,8	138,6	182,3	250,2	
3	14	101,0	81,8	100,0	118,8	153,5	204,7	270,6	579,4	819,4	1032,9	879,2	154,8	204,7	284,5	
2	7	138,8	94,1	111,2	129,4	167,1	267,9	529,4	762,4	904,7	994,1	716,3	138,8	267,9	716,3	
1/12 -12/12	10	160,8	148,2	152,9	160,0	207,1	401,5	641,2	826,5	928,2	1014,7	774,4	183,4	401,5	765,7	
< 1/12 NG.	7	90,5	72,4	75,3	83,5	138,8	319,9	592,9	991,2	1217,7	1432,4	993,5	90,5	319,9	993,5	
< 7 Tg. FG.	10	68,1	47,1	59,4	73,5	100,0	156,9	253,5	755,3	1135,3	1402,9	816,1	97,5	156,9	323,6	

Tabl4 : Creatinin - Gesamtkatecholamin - ausscheidung im 24 Std.-Urin $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \times 10^{-3} \right]$;

Lebensalter (-) - jährl.

PERCENTILLEN

Lebensalter (-jährl.)	n Probanden	Minimum der Referenzwert	PERCENTILLEN										Maximum der Referenzwert	95 % - Vertrauensbereich und		
			2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %	$\bar{x}$				
7	12	0,46	0,37	0,41	0,44	0,55	0,98	1,56	3,50	3,85	4,04	3,66	0,68	0,98	2,58	
6	29	0,44	0,42	0,49	0,59	0,81	1,18	1,89	3,05	4,50	5,68	5,44	0,82	1,18	2,10	
5	21	0,64	0,60	0,66	0,72	0,89	1,23	1,84	3,00	3,16	3,41	3,14	1,06	1,23	1,72	
4	21	0,38	0,34	0,40	0,50	0,82	1,37	2,54	4,24	4,78	4,95	4,84	0,90	1,37	2,68	
3	14	0,56	0,06	0,44	0,73	1,03	1,41	3,23	4,87	5,00	5,09	4,96	0,99	1,41	3,73	
2	7	0,67	0,55	0,59	0,66	0,75	2,11	3,85	5,78	6,91	7,74	5,35	0,68	2,11	5,35	
1/12 -12/12	10	1,54	1,11	1,12	1,17	1,36	1,89	5,45	6,50	6,69	6,85	6,52	1,25	1,89	6,15	
< 1/12 NG.	7	2,12	1,84	1,92	2,00	2,27	3,06	11,29	13,88	14,38	14,81	13,58	2,12	3,06	13,58	
< 7 Tg. FG.	10	0,48	0,00	0,00	0,61	1,53	2,53	3,66	14,91	18,00	18,47	16,58	1,44	2,69	4,75	

Tab. 15: Metanephrin-
Creatinin- ausscheidung im 24. Std.-Urin $\left[\frac{\text{mg}}{\text{mg}} \times 10^{-3} \right]$;

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	Minimum der Referenzwerte	P E R C E N T I L E N										Maximum der Referenzwerte		95 % - Vertrauensbereich		$\bar{x}$
			2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %						
7	12	366,3	295,3	335,3	378,8	460,0	558,1	635,8	711,8	758,8	792,4	703,5	451,6	558,1	647,4		
6	29	118,0	0,0	317,1	388,2	479,4	549,7	649,4	761,8	822,4	870,6	834,0	491,4	549,7	673,2		
5	21	434,7	415,3	436,5	458,8	496,5	587,2	728,2	854,1	1031,2	1214,7	1085,1	496,6	587,2	721,5		
4	21	252,5	182,4	274,1	400,0	563,5	614,7	895,3	1229,4	1425,9	1574,1	1450,6	563,2	614,7	850,2		
3	14	489,8	472,9	482,4	500,0	567,1	681,4	864,7	1368,2	2000,0	2585,9	1853,1	544,7	681,4	830,3		
2	7	94,8	0,0	0,0	0,0	352,9	871,1	1365,5	1805,9	2064,7	2270,6	1738,3	94,8	871,1	1738,3		
1/12 -12/12	10	235,7	0,0	0,0	264,7	726,5	1187,8	1758,8	2220,6	2505,9	2773,5	2393,9	694,6	1187,8	2393,9		
< 1/12 NG.	7	23,0	289,4	349,4	409,4	504,7	614,3	980,0	1658,8	2064,7	2409,4	1511,9	23,0	614,3	1511,9		
< 7 Tg. FG.	10	149,6	0,0	9,4	190,6	440,0	660,1	855,3	1758,8	2294,1	2635,3	1874,8	369,9	660,1	1008,1		

Tabl6: freies Dopamin - ausschcheidung im 24 Std.-Urin $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{mg}} \times 10^{-3} \right]$;
Creatinin -

Lebensalter
(-jahre)

PERCENTILEN

n Probanden

Minimum der
Referenzwerte

2,5 %

5,0 %

10 %

25 %

50 %

75 %

90 %

95 %

97,5 %

Maximum der
Referenzwerte95 % - Vertrauensbereich
und
Median

7	12	1,52	1,06	1,36	1,68	2,09	2,43	3,85	5,36	6,22	6,85	5,43	2,07	2,43	4,06
6	29	0,84	0,69	1,34	2,00	2,47	2,92	3,48	4,35	6,15	8,00	7,52	2,70	2,92	3,24
5	21	0,65	0,11	0,67	1,18	2,00	2,93	3,87	4,71	6,00	7,26	6,19	1,83	2,93	3,80
4	21	1,03	0,00	0,00	1,18	2,08	3,18	4,11	5,00	7,24	8,94	7,61	2,08	3,18	3,84
3	14	1,13	0,00	0,80	1,75	2,62	3,07	3,86	5,82	7,06	8,21	6,54	2,51	3,07	4,07
2	7	1,87	0,00	1,41	1,78	2,27	2,67	4,91	6,95	8,18	9,29	6,54	1,87	2,67	6,54
1/12 -12/12	10	1,43	0,00	0,00	1,27	2,29	3,46	4,56	5,59	6,19	6,72	5,70	2,19	3,46	4,71
< 1/12 NG.	7	0,76	0,25	0,42	0,67	1,42	2,26	5,84	9,52	11,72	13,57	8,82	0,76	2,26	8,82
< 7 Tg. FG.	10	0,60	0,14	0,35	0,58	0,95	1,30	2,55	5,47	7,24	8,47	5,72	0,68	1,30	2,85

Tab.17: Gesamtkatecholaminausscheidung im 24 Std.-Urin $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} / 24\text{h} \right]$;

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	Minimum der Referenzwerte	PERCENTIL EN										Maximum der Referenzwerte	95 % - Vertrauensbereich		$\bar{x}$
			2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %					
7	12	8,3	7,2	7,8	8,9	12,6	23,0	42,7	53,8	56,8	58,4	54,7	12,5	23,0	51,7	
6	29	8,0	8,0	9,4	10,6	13,4	21,0	33,2	57,2	82,7	110,4	103,3	15,0	21,0	35,8	
5	21	12,0	11,5	11,9	14,1	15,9	25,0	34,6	60,7	62,8	71,9	63,9	16,2	25,0	29,2	
4	21	5,0	1,8	4,8	7,6	14,5	23,8	44,2	71,9	88,2	105,9	90,0	15,8	23,8	52,7	
3	14	10,0	8,8	9,5	10,0	13,9	21,5	38,2	68,7	77,2	83,5	74,2	12,1	21,5	49,2	
2	7	7,8	0,0	0,0	0,9	11,8	21,6	36,0	46,8	53,1	59,0	48,8	7,8	21,6	48,8	
1/12 -12/12	10	8,8	5,1	7,0	8,9	12,4	15,7	48,2	54,8	58,6	62,4	54,8	11,5	15,7	51,7	
< 1/12 NG.	7	20,2	16,0	17,7	19,2	24,2	36,2	80,0	120,6	123,1	164,5	113,5	20,2	36,2	113,5	
< 7 TG. FG.	10	4,2	0,0	0,0	3,8	14,2	23,4	38,0	48,8	143,3	214,1	142,9	6,9	23,4	33,3	

Tab.18: Metanephrinausscheidung im 24 Std.-Urin $\left[\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \times 10^{-3} / 24\text{h} \right]$

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	Minimum der Referenzwert	PERCENTILEN											Maximum der Referenzwert	95 % - Vertrauensbereich		$\bar{x}$
			2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %						
7	12	8,11	7,82	8,00	8,29	8,94	10,13	12,24	14,00	15,12	15,94	14,38	9,09	10,13	12,66		
6	29	2,76	2,12	4,71	7,05	8,48	9,64	11,55	12,98	14,61	15,71	14,95	9,64	8,32	10,95		
5	21	8,00	7,12	7,77	8,65	9,92	10,59	11,88	14,41	15,94	17,01	16,03	10,16	10,59	11,99		
4	21	5,48	4,49	5,40	6,49	8,34	10,24	12,29	14,19	15,19	16,07	15,29	8,63	10,24	11,96		
3	14	6,39	5,42	6,04	6,69	8,00	10,61	12,81	14,00	14,59	15,01	14,34	7,95	10,61	13,26		
2	7	0,83	0,00	0,00	0,59	1,74	9,09	16,22	16,67	16,89	16,98	16,61	0,83	9,09	16,61		
1/12 -12/12	10	2,23	0,00	1,41	3,35	6,73	10,43	14,14	17,47	19,44	21,29	17,44	6,19	10,43	15,25		
<1/12 NG.	7	0,30	0,00	0,00	0,00	3,00	7,87	10,71	14,12	16,18	18,42	13,35	0,30	7,87	13,35		
<7 Tg. FG.	10	1,55	0,98	1,26	1,61	2,94	5,59	11,57	13,07	13,81	14,37	13,14	2,14	5,59	12,24		

Tab. 19: freies Dopamin - ausscheidung im 24 Std.-Urin $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{kg}} / 24\text{h} \right]$
 - 75 -

Lebensalter (-jahre)	n Probanden	P E R C E N T I L I E N										M E D I A N und 95 % - Vertrauensbereich		
		Minimum der Referenzwerte	2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	Maximum der Referenzwerte			$\bar{x}$
7	12	40,74	39,41	42,12	45,06	50,82	65,11	93,18	138,82	146,12	150,00	142,72	50,34	65,11 90,15
6	29	20,01	18,00	29,18	43,65	61,29	72,05	83,77	110,00	129,41	190,24	188,01	80,22	72,05 65,98
5	21	14,51	6,80	16,59	28,12	48,24	74,21	91,88	111,77	124,12	167,06	157,60	44,62	74,21 91,62
4	21	24,52	9,18	19,18	30,94	50,71	71,63	94,71	114,12	126,17	185,65	177,46	46,54	71,63 89,53
3	14	26,86	0,00	20,94	36,71	52,94	71,18	88,24	131,18	153,41	155,88	150,00	54,13	71,18 99,03
2	7	41,27	37,18	39,29	41,18	46,82	59,93	118,82	155,29	160,0	163,53	152,20	41,27	59,93 152,20
1/12 -12/12	10	29,33	11,53	21,18	30,71	47,88	73,56	85,06	102,24	111,77	121,41	102,09	43,32	73,56 89,01
< 1/12 NG.	7	12,66	0,00	0,00	0,00	22,35	40,19	85,29	153,53	169,41	183,53	149,23	12,66	40,19 149,23
< 7 Tg. FG.	10	9,28	8,59	9,29	9,65	12,94	22,51	34,12	52,06	79,71	85,00	73,07	10,64	22,51 40,09

Tab. 20 : Gesamtkatecholamin - ausscheidung im 24 Std.-Urin $\left[\frac{\mu\text{g}}{\text{m}^2} / 24\text{h} \right]$

Lebensalter
(-jährl.)

PERCENTILIEN

	n	Minimum der Referenzwerte	2,5 %	5,0 %	10 %	25 %	50 %	75 %	90 %	95 %	97,5 %	Maximum der Referenzwerte	95 % - Vertrauensbereich	und $\bar{x}$
7	12	0,22	0,18	0,21	0,25	0,31	0,50	1,07	1,33	1,49	1,60	1,40	0,31	0,50
6	29	0,20	0,18	0,20	0,24	0,34	0,51	0,82	1,36	1,85	2,78	2,46	0,40	0,51
5	21	0,30	0,28	0,30	0,33	0,40	0,54	0,82	1,12	1,29	1,62	1,53	0,40	0,54
4	21	0,12	0,06	0,11	0,15	0,32	0,49	0,88	1,37	1,66	2,44	2,19	0,32	0,49
3	14	0,23	0,20	0,22	0,24	0,33	0,51	0,92	1,53	1,65	1,72	1,61	0,29	0,51
2	7	0,18	0,14	0,14	0,16	0,22	0,51	0,80	1,11	1,29	1,45	1,14	0,18	0,51
1/12 -12/12	10	0,15	0,04	0,10	0,15	0,29	0,33	0,94	1,08	1,16	1,25	1,12	0,21	0,33
1/12 NG.	7	0,34	0,21	0,23	0,28	0,39	0,60	1,37	1,90	1,99	2,03	1,84	0,34	0,60
7 Tg. FG.	10	0,06	0,00	0,00	0,08	0,22	0,36	0,46	0,56	1,92	1,96	1,87	0,11	0,36

Tab. 21.: Metanephrin - ausscheidung im 24 Std.-Urin $\left[\frac{\text{mg}}{\text{m}^2} / 24\text{h} \right]$

PERCENTILIEN

BEDIAN
und

95 % - Vertrauensbereich

Maximum der
Referenzwerte

Minimum der
Referenzwerte

Lebensalter
(-jahre)

7	12	194,4	161,2	179,1	198,8	234,4	260,8	309,4	338,2	367,7	381,1	341,7	232,8	260,8	319,2
6	29	68,1	16,2	108,2	179,7	211,2	247,2	279,4	310,6	372,1	414,7	392,4	211,9	247,2	276,3
5	21	194,2	150,0	166,2	186,8	221,2	257,2	279,1	331,5	354,4	368,2	352,4	238,8	257,2	286,3
4	21	128,4	106,8	126,5	150,0	190,3	243,5	279,7	320,0	345,3	401,5	389,6	202,7	243,5	266,9
3	14	155,4	133,5	143,5	154,4	177,1	248,0	302,4	327,9	335,3	338,2	319,7	171,4	248,0	316,1
2	7	16,6	0,0	0,0	8,8	38,8	206,6	363,2	294,1	398,5	423,5	392,1	16,6	206,6	392,1
1/12 12/12	10	44,1	0,0	0,0	50,0	138,8	201,8	275,9	310,0	317,9	326,5	310,6	106,2	201,8	302,2
1/12 NG.	7	4,81	0,0	0,0	0,0	49,41	119,1	172,9	228,8	261,5	291,8	225,8	4,8	119,1	225,8
7 Tg. FG.	10	26,24	22,7	23,9	26,6	40,0	88,2	140,0	165,7	180,4	191,3	167,8	33,6	88,2	148,5

Tab.22: freies Dopamin - ausscheidung im 24 Std.-Urin $\left[\frac{\mu g}{m^2} / 24h \right]$

3. Standardisierter Fragebogen:

ANGABEN ZUM KIND :

Zutreffendes bitte ankreuzen ☒

Name : Vorname :

Geburtsdatum : Geschlecht : weiblich ☐
männlich ☐

Anschrift der Eltern :
.....

Telefon - Nr./.....

Sammlung des 24 - Std.-Urins am : |

Gewicht des Kindes : |

Größe des Kindes (in cm) |

Das Kind ist z. Zeit : gesund ☐ ; krank ☐ wenn ja,
welche Krankheit :
.....

War Ihr Kind während der letzten

3 Monate krank ☐

Wenn ja,
welche Krankheit?

.....

Nimmt Ihr Kind z. Zeit Medikamente,
Salben, usw. ☐

wenn ja, welche und
wieviel?

.....

.....

.....

Nahm Ihr Kind innerhalb der letzten 3 Monate

Medikamente, Salben usw. ☐

Wenn ja, welche, wieviel

.....

.....

Bisherige Krankheiten

des Kindes :

.....

.....

Operationen, welche

wann?

.....

Sonstige Krankenhaus-

aufenthalte :

weswegen, wann?

.....

Nierenerkrankungen ja ☐ welche

nein ☐

Wie würden Sie die körperliche Aktivität Ihres Kindes einschätzen

überwiegend passiv ☐

ruhig ☐

aktiv ☐

überdurchschnittlich aktiv ☐

War die körperliche Aktivität des Kindes am Tag des Urinsammelns:

wie sonst auch ☐

erhöht ☐

Ist oder war Ihr Kind in letzter Zeit irgendwelchen seelischen oder geistigen Belastungen (Erlebnisse, Verlust nahestehender Dinge, Freunde Verwandter, oder Spannungen anderer Art) ausgesetzt :

_____ ja _____ ☐

nein ☐

Das Kind verbringt den Tag meist

zu Hause ☐

im Kindergarten ☐

bei Bekannten ☐

Das Urinsammeln verlief mit Zwischenfällen oder Nichtbeachtung eines Punktes der Sammelvorschrift:

nein ☐

wenn ja, welcher Fehler wurde gemacht? :

Es wurde gesammelt: 24 Std.-Urin ☐

4. Sammel- und Ernährungsvorschrift

VORSCHRIFT FÜR DAS SAMMELN VON 24 - STUNDEN - URIN

Damit der gesammelte Urin bei der Analyse im Labor **verwertbare** Meßwerte ergibt, ist es notwendig folgende Sammelvorschrift genau einzuhalten:

- Sie erhalten von uns:
- 1) ein großes gläsernes Sammelgefäß
 - 2) einen Abfülltrichter
 - 3) einen kleinen mit HCl-gefüllten Plastikbecher (Vorsicht ätzender Inhalt)

Gesammelt werden muß der gesamte Urin Ihres Kindes während der Dauer von 24 Stunden.

- 1) Gleich nach dem Aufstehen am Morgen lassen Sie Ihr Kind Urin absetzen. Diesen Urin schütten Sie in die Toilette. Er gehört noch nicht zum Sammelurin.
- 2) Sämtlicher weiterer Urin muß nun vollständig gesammelt werden:
- 3) Der nächste Urin wird gleich nach dem Absetzen (am besten in einen Nachttopf) mittels des Trichters in die Sammelflasche gefüllt. Anschließend gießen Sie sofort die Salzsäure aus dem kleinen Plastikbecher ebenfalls mittels des Trichters in die Sammelflasche.
- 4) Jeder weitere Urin muß nun sofort nach dem Absetzen in die Sammelflasche gefüllt werden.

Gesammelt wird nun den ganzen Tag einschließlich der Nacht. Am besten lassen Sie Ihr Kind direkt vor dem Schlafengehen noch einmal Urin absetzen.

- 5) Gleich nach dem Aufstehen am Morgen lassen Sie Ihr Kind Urin in den Nachttopf absetzen und füllen diesen ersten Morgenurin ins Sammelgefäß. Damit ist dann der Sammelvorgang des 24 - Stunden - Urins abgeschlossen.
- 6) Verschließen Sie das Sammelgefäß und bewahren es bis zur Abholung am selben Tag auf.

BITTE BEACHTEN SIE :

Sollte Ihrem Kind aus Vergeßlichkeit oder Unachtsamkeit es passieren, daß nicht sämtlicher Urin gesammelt wird oder nicht nach genau vorangehendem Schema verfahren wird, so scheuen Sie sich bitte nicht, dies bei der Abgabe des Urins anzugeben. Denken Sie bitte daran, daß nur mit Hilfe von genauester Beachtung der Sammelvorschrift verwertbare Meßergebnisse zu erreichen sind, welche in Zukunft die rechtzeitige Erkennung einer schweren Krankheit im Kindesalter ermöglichen werden.

Bewahren Sie das kleine Plastikfläschchen mit der Salzsäure unreichbar für Ihr Kind auf.

(Stark ätzend! 6n HCl)

Sollte beim Umfüllen etwas von der Salzsäure an die Haut gelangen, spülen Sie die Haut mit reichlich Leitungswasser gründlich ab.

Sollte Salzsäure verschluckt werden, lösen Sie kein Erbrechen aus, lassen Sie Milch oder gequirktes Ei (weiß) trinken und verständigen Sie sofort Ihren Hausarzt.

Ernährungsvorschrift für das Kind:

Bitte verzichten Sie auf die Ernährung des Kindes mit Kaffee, Tee, Schokolade und Bananen 1 Tag vor, sowie während des Sammeltages.

Dank

Vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Juni 1980 bis Dezember 1982 am Institut für Klinische Chemie des Städtischen Krankenhauses München - Schwabing.

Herrn Prof. Dr. O.H. Wieland, der das Thema zu dieser Arbeit anregte, möchte ich herzlich danken für wertvolle Diskussionen, die notwendige Kritik und großzügige Unterstützung in vielfacher Hinsicht.

Ganz besonderen Dank Herrn Dr.E. Schleicher und allen anderen Mitarbeitern im Klinischen Institut für die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen, praktische Hilfe und manchmal auch seelischen Beistand.

Herzlichen Dank auch den zahlreichen Eltern und Kindergartenbediensteten, welche durch ihre Bereitschaft das Sammeln der Proben erst ermöglichten, stellvertretend für Alle Frau A. Petzold, Gröbenzell.

Besonders herzlichen Dank meinen Eltern, Martin und Martha Petzold, die durch ihre großzügige Unterstützung, Geduld und Nachsicht mich stets förderten.

Meine Freunde bitte ich um Entschuldigung für die Zeit der Ungastlichkeit und danke für das Verständnis während vieler Monate und Abende, die ich mit dieser Arbeit statt mit ihnen verbracht habe.

Lebenslauf

Name: Joachim Petzold

Geburtsdatum: 26.06.1953

Geburtsort: Augsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Martin Petzold, Patentingenieur
und Martha Petzold, geb. Hölig

- 1959 - 1963 Besuch der Volksschule in Lauingen/Donau
- 1963 - 1973 Besuch des Johann-Michael-Sailer-Gymnasiums,
math.-nat. Zweig in Dillingen/Donau
- 1973 - 1975 Verpflichtung zur Bundeswehr, Entlassung als
Leutnant d. Res.
- 1975 - 1976 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-
Universität in München, freiwilliger Abbruch
des Chemiestudiums um wegen der Parkstudium=
regelung eine spätere Zulassung zum Studium
der Medizin nicht zu gefährden
- 1976 - 1978 Krankenpflegepraktikum im Kreiskrankenhaus
Lauingen und Tätigkeit als Laborant im
Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried,
- 1978 - 1984 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
- 1980 - 1982 Anfertigung vorliegender Dissertationsarbeit
am Institut für Klinische Chemie des
Städtischen Krankenhaus München - Schwabing
- 1984 Approbation als Arzt
- ab Mai 1985 Assistenzarzt in der II. Medizinischen Klinik
im Zentralklinikum Augsburg

